

## 土壌微生物アセスメントの背景(1) 検出 ・ 定量の 諸問題

著者	東北大学遺伝生態研究センター
雑誌名	IGEシリーズ
巻	7
ページ	1-77
発行年	1990-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/49093">http://hdl.handle.net/10097/49093</a>

IGEシリーズ 7\*\*\*

# 土壤微生物アセスメントの背景(1)

— 検出・定量の諸問題 —



IGE

東北大学遺伝生態研究センター  
Institute of Genetic Ecology

## IGEシリーズの発刊にあたって

地球上の環境は、今、かつてない大きな問題に直面しております。世界各地で進行している生態系の急速な変化のなかには、人間生活に深刻な影響をもたらす可能性のあるものが、多数含まれています。一方、人間の活動が宇宙空間へと拡がるにつれ、地球外生態系の構築が、新しい課題として登場しつつあります。生態系の崩壊を防ぎ、より豊かな環境を創造するための科学的努力が、今日ほど強く求められている時はありません。

本研究センターは、DNA 分子技術を中心に遺伝子的段階にまで到達した生物研究の諸成果を生かし、生態系における生物の生活を一層深く解明し、新たな人間環境の創造に貢献することを目指しております。いうまでもなく、この課題はきわめて学際的であり、多分野の研究者との相互交流と協力によって、はじめて達成されるものであります。本研究センターでは、ワークショップによる研究者間の討論と意見交換を重視するとともに、その成果をより多くの方々にご利用いただく出版活動にとり組んでおります。ここに発刊します IGE (Institute of Genetic Ecology の略) シリーズも、こうした努力

の一環であります。

本シリーズの内容は、多岐にわたる可能性をもっておりますが、3つのタイプに大きく類別されるだろうと考えております。すなわち、(i) 特定のテーマ、又はトピックについての解明に関するもの（\*印を付します）、(ii) 特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献、実験法の紹介に重点をおくもの（\*\*印）、そして(iii) 新しい可能性を求める学際的交流、対話を試みるもの（\*\*\*印）であります。

このIGEシリーズが、多方面の方々のお役に少しでも立つことを願って、発刊の辞とします。

1989年3月

東北大学遺伝生態研究センター

## ❖ 目 次 ❖

はじめに 服部 勉 .....	1
1. 自然界における破傷風菌の分布	
—— とくに定量的分析の試み ——	
海老沢 功 .....	3
2. 土壤中のボツリヌス菌 阪口 玄二 .....	15
3. 土壤中の軟腐病菌 菊本 敏雄 .....	27
4. 土壤中の軟腐病菌のファージ特異性	
富樫 二郎 .....	41
5. 土壤中のセルロース分解菌の分布	
山本 広基 .....	55
6. 平板法による土壤中の細菌の検出・定量	
服部 勉 .....	67
7. 微生物アセスメントをめざして	
—— まとめに代えて —— 服部 勉...	75

# はじめに

服 部 勉

---

本書は、遺伝生態研究センターが1989年11月7-9日開催したワーク・ショップ「遺伝子組換え微生物の野外実験のための微生物アセスメント」の成果に基礎をおいたものであります。

自然環境、とくに土壤環境に住む微生物は、人間生活にどの程度安全なのかという問題は、微生物学の誕生の時から、重要な課題でした。しかし過去100年余りの間、微生物学はこの問題の解明において、余り大きな進歩を見せませんでした。土壤中に住む各種細菌の検出・定量は、今だに多くの困難に悩まされております。組換え微生物の野外放出となりますと、問題はさらにその遺伝子のゆくえとその影響にまで広がります。

今回のワーク・ショップでは、こうした事情を念頭に置きつつ、「野外放出」以前の土壤環境での微生物の検出・定量の諸問題について、それぞれの専門の立場からお話を願いました。ヒトや動物の恐怖の的となる破傷風菌やボツリヌス菌と野菜栽培の強敵、野菜軟腐病菌などの重要微生物をとりあげるとともに、各種微生物の住み場所・分布の問題や増殖の問題にも切りこんでいただきました。

土壤環境中の微生物の検出・定量とその生態的評価の問題は、これまでごく限られた分野の方々に関心事でありました。本書の発刊を機会に、より多くの専門分野の方々が、この問題に関心をお寄せ下さることを切望いたします。



# 1. 自然界における破傷風菌の分布

## —— とくに定量的分析の試み ——

海老沢 功

### 1. はじめに

破傷風菌は土壤内に広く分布し、また人を含む動物の糞便からも分離されることが知られています。しかしこれらの資料中の破傷風菌を定量的に調べた文献は、土に関してはほとんどなく、大抵 1~2 g, まれに“少量”の土を検体として分離を試み、何 % くらい陽性の成績がえられるかという報告しかありません。動物の糞便内破傷風菌についても、定性的に各種動物について、陽性率を求めた報告があるだけです。

これは破傷風菌を人や動物に対する病原体として考える医学的立場から研究されてきたためです。土壤中の常在菌として、そのエコロジーの立場からの考察はされていません。また動物の糞便中の破傷風菌に関してはそれが動物の腸管内で増殖するのか否か、あるいは単なる通過菌なのかということは真剣に考慮されていなかったと思います。

### 2. 定量化の方法

土は乾燥、細挫したあと金属性紅茶こしと 2 枚のガーゼでこしたものを 10 mg までは天秤で秤量、それ以下は 0.5% に寒天を加えたブイヨンで適宜希釈して所要量の土を培地に接種しました。破傷風菌の分離には資料を：1) 肝肝ブイヨンあるいは GAM ブイヨンで 35°C, 2 日間増菌, 2) 培養液の上清約 0.5 ml を毛細管で GAM 斜面培地の斜面とガラス壁にふれない



ように注意しながら、その凝固水に接種、35°Cで2日間嫌氣的培養を行いました。破傷風菌が寒天斜面上に這上がってきたら、薄膜状コロニーの先端部分から破傷風菌を分離しました。グラム染色で混合感染が疑われたら分離菌を3%に寒天を加えたGAM平板培地上に塗抹して単離コロニーを作らせてから肝タブイオンに接種して再分離しました。3) 同定はマウスに対する毒性と抗毒素による中和、ゲラチン液化、3%寒天加血液平板を用いて溶血性の確認と破傷風抗毒素による溶血阻止などによって行いました。詳細は文献1, 2, 3参照。

### 3. 土壌内破傷風菌の分布と密度

#### 3-1) 半定量的研究

検査材料は畑と民家の庭、田および川と池の岸辺、学校と公園内（花壇を含める）、牧場、道路など計164カ所の地表の上を集めました。前処理して200, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 mg ずつ計8本の肝タブイオンで増菌して破傷風菌を分離しました。各サンプルにつき、破傷風菌が分離された最も少ない土の量をそのサンプルの代表値としました。

全体としては破傷風菌分離率は50%であったが、採取場所に関しては田や川・池の岸辺（76%）、畑や踏み固められていない民家の庭（64%）から多く分離され、牧場（30%）や道路上の土には破傷風菌は多くない所見を得ました。計算上1 mgに相当する土から12検体（7.3%）が陽性の成績を

表1 表層土からの半定量的破傷風菌分離実験成績

土採取場所	破傷風菌に必要な土の最小量 (mg)								分離陽性	総検体数	分離率%
	200	100	50	25	10	5	2.5	1			
畑, 民家庭	1	6	4	9	6	4	4	8	42	66	64
田, 川池岸		1		3	2	1	3	3	13	17	76
学校, 公園	1	3	2	8	1	1	3	1	20	51	39
牧場		1	2		3				6	20	30
道路				1					1	10	10
合計	2	11	8	21	12	6	10	12	82	164	50.0

表2 畑, 水田, 民家庭の地表面と地下からの破傷風菌分離成績

土採取 場所	破傷風菌分離に必要な土の最小量 (mg)			分離 陽性	総検 体数	分離 率%
	≥25	5~10	1~2.5			
地表	33	11	13	47	74	64
地下	3	2	5	*10	35	28
合計	36	13	18	57	109	52

\*この他にマウスに破傷風を起こすが破傷風菌分離に不成功のサンプル 2 つあり。 $\chi^2=12.95$ ,  $p<0.01$

示しました。このように微量の土から破傷風菌が分離されるのは破傷風菌が高率に分離される上記 4 つの場所から採取した標本に多く見られました (表 1)。

畑, 田, 民家の庭の地表面で以前破傷風菌が 1 mg の土から分離された場所を含めて 6~12 月後に, 地表と地下 5, 10, 15, 20, 30 cm から採取した土について同じように破傷風菌の分離を試みました。同じ場所を再検査しても, 地表面からの破傷風菌分離成績は変化していました<sup>1)</sup>。すなわち前回より多量の上を破傷風菌分離に必要としたことがありました。また地下 5 cm 以下では破傷風菌の分離率とその密度が低い所見が得られました (表 2)。

### 3-2) 定量的分離実験

以上の実験では土の各々の量につき 1 本の肝タピオンに接種・増菌して菌分離を試みました。以下に述べる実験では一定量の土につき 5 本の GAM プイオンに接種して定量的分析を行いました。

#### a) 舗装道路上の土

1 km 間隔で採取した舗装道路上の土 30 検体につき, 200, 20, 2, 0.2 mg の土を GAM プイオンに接種, 2 日間の増菌後 GAM 斜面培地を用いて破傷風菌分離を行いました。30 検体中 13 検体が陽性で, その分離状況を表 3 に示します。一般に陽性の試験管が少なく, 菌数を計算しにくい成績ができました。前回の方法 (表 1) では土 10 検体中 1 検体のみ陽性でしたが, この実験では試験管数を各接種量につき 5 本, 合計 15~20 本に増したので分

表3 道路上土サンプルからの定量的破傷風菌分離

標本番号	接種した土の量 (mg)			
	200	20	2	0.2
K1, K2	*1/5	0/5	0/5	
K3~K8	1/5	1/5	0/5	
K9	0/5	3/5	0/5	
K10	1/5	1/5	0/5	1/5
K11	1/5	1/5	0/5	0/5
K12	4/5	1/5	0/5	0/5
K13	4/5	1/5	2/5	1/5

表は各標本の各接種量を5本の培地に接種した成績(分母)。分子は、破傷風菌分離陽性の試験管の数を示す。標本番号14~30はすべての試験管で破傷風菌陰性のため表から除いた。

離率は43%に上がりました。しかし200 mg接種で5本中1本のみが陽性というように極めて菌数が少ないもの、その他土壌内破傷風菌の分布が不平等である所見が見られました(表3)。

#### b) 人工的に大量の破傷風菌を加えた土からの破傷風菌分離

内径約12 mmのビニール管に予備試験で破傷風菌陰性の土を約25 cmの高さにつめ、水道水で十分に湿らせました。その上層に $10^{7.49}$  CFU(colony forming unit)の破傷風菌胞子を食塩水1.0 mlに薄めて流し、さらに反復して水柱にして2~5 cmあるいは10 cmの水を加えました。水柱の高さにして計50~60 cmの水を静に流した後の上部の土を乾燥して定量的に調べました。

その結果はもっときれいなデータがでて、単位重量当りの破傷風菌の密度を計算できる成績がでました(表4)。すなわち破傷風菌の密度が高ければきれいなデータがでることが示されました。これと舗装道路上の土に関する成績を比較すると、後者の上の中の破傷風菌は少なく、その分布は不均等なことがよく分かります。破傷風菌の密度が高い田畑の土についても同じような実験をしてみたいと考えています。

表4 人工的に破傷風菌を加えた土からの定量的破傷風菌分離成績

標本番号	接種した土の量 (g)						CFU/g of soil
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
211	5/5*	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	$1.30 \times 10^5$
217			5/5	5/5	3/5	0/5	$7.90 \times 10^5$
218			5/5	5/5	3/5	0/5	$7.90 \times 10^5$

\* 分子は陽性, 分母は接種試験管数

#### 4. ヒトおよび動物の糞便内破傷風菌

破傷風菌はヒトおよび動物の腸管内常在菌であり, その分離率も極めて高いと主張する人がいます。これは本菌の腸管内定着の問題を含めて重要なことですが, 糞便内破傷風菌を定量的に調べた文献は少ないものです。わずかに Tenbroeck たち<sup>4)</sup>がヒトの糞便中に 1 g 当り  $10^{4-6}$  コの破傷風菌がいると報告しているだけです。しかしこの論文ではヒトの糞便中 35% が破傷風菌が陽性であり, 破傷風菌はヒトの腸管の常在菌であるとしています。この論文はしばしば引用されますが, このような高い分離率を確認した報告は他にはありません<sup>3)</sup>。

##### 4-1) ヒトおよび動物の糞便からの破傷風菌分離率と糞便内破傷風菌の密度<sup>3)</sup>

この実験では GAM 液体培地 10 ml にヒトおよび動物の糞便を約 0.25 g ずつ 4 本接種, 2 本は 60°C 10 分, 2 本は非加熱のまま 35°C, 2 日増菌培養して破傷風菌を分離しました。4 本のうち 1 本でも陽性の成績がえられたときはその検体を陽性として計算しました。

表5に示すようにヒトと牧場にいた犢が0, 捕獲された野犬と競争馬が2と1%, 牛舎内の牛が4%, 北大農場の牛が8.3%で日本国内で調べた動物ではもっとも高い分離率が得られました。放牧中の羊の糞は西ドイツ Tübingen で採取したもので, 25% の高率で破傷風菌が分離されました(表5)。日本の羊については検査していません。この高い分離率は羊と馬, 犬, 牛という動物種の違いによるものか, あるいは羊と牛や馬では牧草の食べ

表5 ヒトおよび動物の糞便からの破傷風菌分離成績

動物種	陽性数/検体数 (%)	95% 信頼限界*
ヒト	0/201 (0)	1.5-0
牛 (1)	4/100 (4)	10 -1
牛 (2)	3/ 36 (8.3)	17 -1
子牛	0/ 41 (0)	7 -0
馬	1/100 (1)	5 -0
羊	10/ 40 (25)	44 -14
犬	1/ 50 (2)	11 -0

牛 (1) は牛舎内の牛, 牛 (2) は牧場内の牛。馬は競争馬, 羊は牧場内の羊 (西ドイツ), 犬は捕獲された野犬。

\*分離率の 95% 信頼限界。

方が異なるため分かりません。

ただし破傷風菌陽性の動物の糞便の定量的検査では約 0.25 g の糞便を 4 本の培地に接種すると 1~2 本から分離できましたが, 0.1 g からは 5 本接種してもせいぜい 1 本しか破傷風菌が分離されず, 定量的検査はできませんでした。糞便からの破傷風菌分離には混在する他の細菌による干渉の問題もありますが, その菌量は多くないと考えています。[実験的には *C. perfringens* と G 群 *Streptococcus* が大量混在すると破傷風菌が GAM 斜面培地を這上がるのを妨害することが証明されています。]

#### 4-2) マウス腸管内における破傷風菌増殖<sup>2)</sup>

はたして動物の腸管内で破傷風菌が増殖できるのか否かについてマウスの胃内に一定量の破傷風菌を注入し, 糞便内破傷風菌を毎日定性と定量的に 2~3 週間追跡しました。この実験で得られた結論は:

i) 接種後 24 時間以内では表 6 に示すように大量の破傷風菌が定量的に分離され, その量を便宜上糞便 1 g あたりの MPN の形で算出することができました。その量は接種量と相関関係があります。横軸に接種菌量 CFU の対数, 縦軸にマウス糞便 1 g 当りの菌量 MPN の対数をとって図示すると  $Y=0.979 \times -0.561$ ,  $r=0.937$ ,  $P<0.01$  の値が得られました(表 6 と図 1)。なおマウスの 1 日の糞便量は 1~2 g です。

表6 糞便からの定量的破傷風菌分離実験

サンプル 番号	接種 菌量	糞便の希釈倍数と破傷風菌分離成績						MPN/g (log unit)
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
429	*6.55	5/5	4/5	5/5	4/5	1/5	0/5	5.24
455	6.55	3/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	5.90
467	6.55	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	5.85
594	5.18	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5		5.11
595	5.18	1/5	3/5	4/5	1/5	0/5		4.23
598	4.18	5/5	5/5	3/5	3/5	0/5		4.24

\*単位はコロニー形成菌数の10の対数。破傷風菌胞子を0.5 mlの食塩水に浮遊させてマウスの胃内に注入、その後24時間内に排泄された糞便について定量的に分離実験を行った。

Dose of inoculum vs the MPN of *C. tetani*  
per g of the stool of mice excreted during the  
first 24hrs

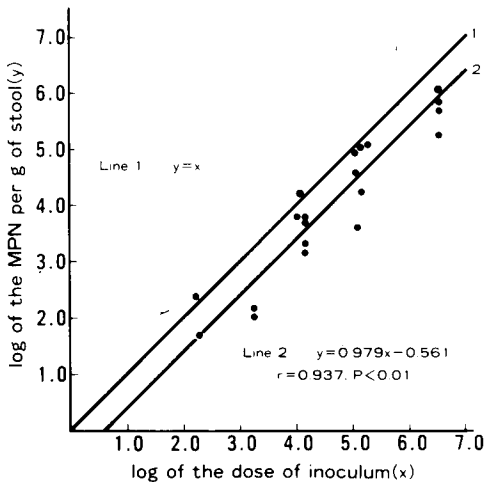


図1 マウスに経胃接種した破傷風菌胞子の菌量と24時間以内に糞便に排泄されたg当りの菌量の相関関係

Quantitative recovery *C. tetani* from the stools  
of mice following intragastric inoculation on Day 0  
Dose of inoculum =  $10^{6.55}$  C.F.U.

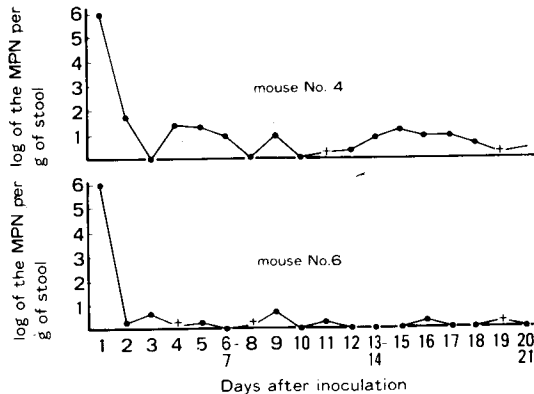


図2 大量( $10^{6.55}$ )の破傷風菌孢子経胃接種後の糞便内破傷風菌の排泄状況

$10^{6.55}$ の破傷風菌孢子を含む土の量はこれを最も多く含む土の約1-3 kgに相当する。

ii) 2日目以後は  $10^{6.55}$  CFU の大量の孢子を飲ませた後は頻回に糞便から分離されましたが、その量は 1 g 当り  $10^2$  を超えることはありません(図2)。それ以下の接種菌量では分離回数も糞便内菌量も減少して、極めて少量の破傷風菌が、短期間しか分離されません(図3)。これらの図で菌量が+印で示されているのは、0.25 g の糞便からは1~2本の試験管から破傷風菌が分離されたが、0.1 g を接種した試験管からは分離できなかったことを示しています。

以上の成績から、少なくともマウスの腸管は破傷風菌の増殖には好都合な環境ではないと考えられます。また土の中の破傷風菌数がせいぜい 1 g 当り  $10^3 \sim 10^4$  コとすると実験に用いた菌量はマウスが土として摂取する量をはるかに越えるものであり、自然界では起こりえない量です。

馬、牛、犬、羊などの動物の糞便内破傷風菌の分布は羊を除き少ないこと、かつ陽性の糞便内破傷風菌の密度が高くないことは、自然環境における破傷風菌の分布に果す動物の役割は多くないことを示すと考えられま

# Quantitative recovery of *C. tetani* from the stools of mice following intragastric inoculation on Day 0

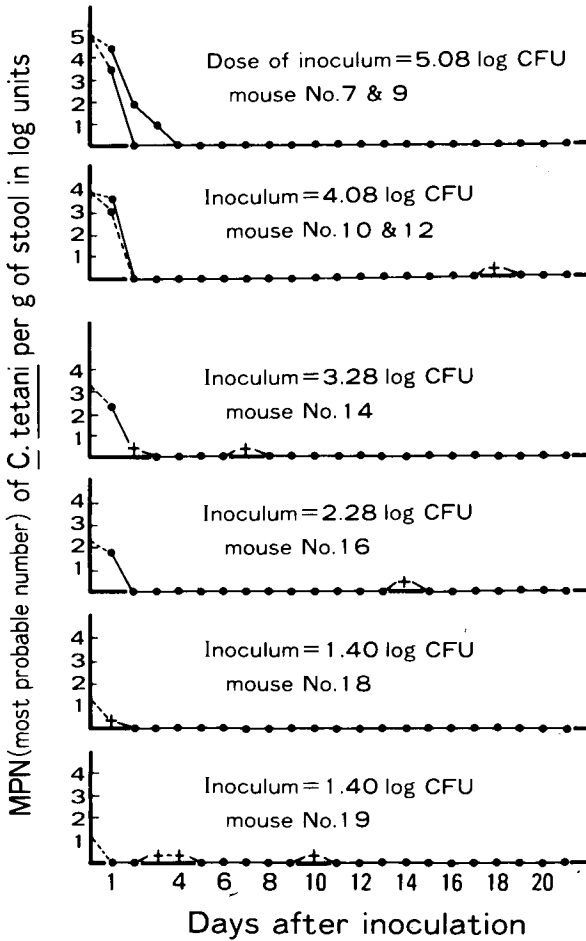


図3 大～少量の破傷風菌胞子を経胃接種した後の糞便内破傷風菌の排泄状況

す。破傷風菌は動物の腸管内で増殖し、その糞便を介して地表面にばらまかれるという考えは支持できません。私が岩手県小岩井牧場などで集めた土の中の破傷風菌は分離率とその密度は田畑の土よりはるかに低いもので



した。

## 5. 新鮮創傷内破傷風菌<sup>5)</sup>

医学的に問題になるのは創傷面に破傷風菌を含む微量の土が附着して破傷風という病気を起こすことです。そこで治療前の創傷面にどれくらい破傷風菌がいるかを検討するため、救急車で搬入された外傷患者の創傷面擦過物から破傷風菌の分離培養を試みました。その結果2月間に103人中2人(1.9%)から破傷風菌が分離されました(95%信頼限界7-0%)。なおウェルシ菌 *C. perfringens* は4人(3.7%)から分離されました(表7)。ただしいずれの患者も破傷風やガス壊疽には罹患していません。これは2月間の経験ですから、簡単な計算で1年に12人、10年に120人の破傷風菌に汚染された外傷患者がいたことになってしまいますが、その病院では破傷風患者は1人も発生していません。外科的処置を十分に行えば破傷風にはかからないということです。創傷面から破傷風菌が分離されるには何mgの土が付着していることが必要なのでしょうか。少なくとも肉眼的に直ぐ目立つほどの土は多くの場合ついていないでしょう。前記定量的検査から想像できるように1mg(表1)、あるいは0.2mg(表3)の土がついていれば、陽性になることがあるものと思います。

表7 外科的処置前の外傷患者103人からの破傷風菌、ガス壊疽菌(ウェルシ菌)などの分離成績

分離菌種	分離数(%)	95% 信頼限界*
破傷風菌	2 (1.9)	7-0
ウェルシ菌	4 (3.7)	10-1
ブドウ球菌 (coas. +)	10 (9.3)	18-5
G群レンサ球菌	1 (0.9)	5-0
大腸菌	1 (0.9)	5-0

\*分離率の信頼限界

## 6. ま と め

破傷風菌は土の中の常在菌で、とくに踏み荒らされていない民家の庭、畑、田、川や池の岸边から容易に分離され、約半数の陽性例では 10 mg 以下の土から分離できました。動物の腸管内にも破傷風菌はいますが、その分離率は低く、糞便内の密度は低い。マウスの腸管内では破傷風菌は極めて大量を接種した場合のみ定着した所見がえられました。破傷風菌は本来土のなかの常在菌と考えられます。

## 参考文献

- 1) Ebisawa, I., M. Takayanagi & M. Kigawa : Density and distribution of *Clostridium tetani* in the soil. Japan. J. Exp. Med., 56 : 69-74, 1986.
- 2) Ebisawa, I., M. Kigawa & M. Takayanagi : Colonization of the intestinal tract of mice with *Clostridium tetani*. Ibid., 57 : 315-320, 1987.
- 3) Ebisawa, I., M. Takayanagi and M. Kigawa : Some factors affecting isolation of *Clostridium tetani* from human and animal stools. Ibid., 58 : 233-241, 1988.
- 4) Tenbroeck, C. & J.H. Bauer : The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man. J. Exp. Med., 36 : 261-271, 1922.
- 5) 高柳満喜子, 海老沢功, 城川美佳, 山本修三 : 破傷風菌の外傷創への附着状況と薬剤感受性. 東邦医学会雑誌, 35 : 9-18, 1988.



## 2. 土壌中のボツリヌス菌

阪口 玄二

### 1. ボツリヌス菌とは

ボツリヌス菌 (学名は *Clostridium botulinum*) はクロストリジウム属の200以上ある菌種の一つです。クロストリジウム属菌は芽胞を形成する嫌気性、グラム陽性の桿菌ですが、恐ろしいボツリヌス中毒を起こすボツリヌス毒素を産生する菌をボツリヌス菌と呼び、性状の異なる種々の菌を含みます。性状により4群に分類されています(表1)(Smith, 1977)。各群の生化学的性状を表2に示します。毒素の抗原性により、AからG型までの7型に分類されています。ヒトの中毒は主としてA, B, E型毒素でおこり、F型中毒も数例報告されています。C, D型毒素は動物(哺乳類, 鳥類)

表1. 生物性状によるボツリヌス菌の分類

性 状	群			
	I	II	III	IV
蛋白分解	+	—	—	+
ゼラチン液化	+	—	+	+
毒素型	A, B, F	B, E, F	C, D	G
芽胞耐熱性	120°C 4分	80°C 6分	100°C 15分	
発育最適温度	37~39°C	28~31°C	40~42°C	
発育最低温度	10°C	3.3°C	15°C	
ブドウ糖酸酵	+	+	+	—
リパーゼ産生	+	+	+	—

表2. *C. botulinum* I, II, III, IV 群, *C. butyricum*, および *C. barati* の性状

菌	レシチ ナーゼ	ミルク	ゼラ チン	ブド ウ糖	乳糖	マ ン ジ ン ス	NO <sub>3</sub> 還元	運動性	毒素型
<i>C. botulinum</i>									
I 群	—	D	+	+	—	—	—	+	A, B, F
II 群	—	—	—+	+	—	+	—	+	E, B, F
III 群	—(+)	D(—)	—+	+	—	+	—	+	C, D
IV 群	—	D	—	—	—	—	—	+	G
<i>C. butyricum</i>	—	St	—	+	+	+	—	—	E
<i>C. barati</i>	+	—	—	+	+	+	+	—	F

D=消化; St=強く発酵.

の中毒をおこします。普通1菌株は1種類の毒素を産生しますが、A型とF型、A型とB型、2種の毒素を産生する菌株も報告されています。C型菌はC<sub>1</sub>毒素と少量のD毒素を、D型菌はD毒素と少量のC<sub>1</sub>毒素を産生します。C、D型菌の多くの株はさらにC<sub>2</sub>毒素と呼ばれる毒素を産生します。C<sub>2</sub>毒素は神経毒ではなく、下痢をおこすエンテロトキシンです。冷蔵庫内でも増殖して毒素を産生するのはII群菌です。

芽胞形成能は菌型によって異なり、同一菌株でも環境によって異なります。I群菌は多数の芽胞を形成しますが、II群およびIV群菌はあまり芽胞を形成しません。芽胞の耐熱性は、I群菌は最高(殺菌には120°C 4分以上の加熱が必要)、II群菌は最低(数分の煮沸で死滅します)、III群菌はその中間の抵抗性を示します。

ボツリヌス菌芽胞は内陸の土壌、海や湖沼の底の泥に分布しています。従って、農作物、魚介類、種々の動物などは本菌芽胞で汚染されています。乳児ボツリヌス症では蜂蜜が芽胞を媒介すると考えられています。

ボツリヌス中毒は、食品中で産生された毒素の摂取で起こる『食餌性ボツリヌス中毒』が普通の型です。乳児が芽胞を摂取して消化管内で産生された毒素による『乳児ボツリヌス症』、創傷局所で産生された毒素による『創傷性ボツリヌス症』も知られています。ボツリヌス中毒はヒトだけではなく、種々の動物(哺乳類、鳥類、魚類)も罹ります。

## 2. 土壌その他の試料の採取

ボツリヌス菌の検査は図1の手順で行います。

土壌試料の採取には特に注意すべきことはありませんが、試料の数と量、採取場所は重要です。通常1か所から50g以上の試料を滅菌容器（ポリエチレン袋を用います）に採取します。試料は袋の中でよく混合し、直ちに試験できない時は常温で保存します。遠隔地へ輸送する場合も特に冷却する必要はありません。患者の材料（血液や大便）を検査する時には、試料は低温に保ち速やかに検査室に輸送します。新鮮な生魚、生肉などはそのまま増菌培地として用いることが出来ますが、鮮度の悪いものや、加工品はそのまま増菌培地に用いることは出来ません。

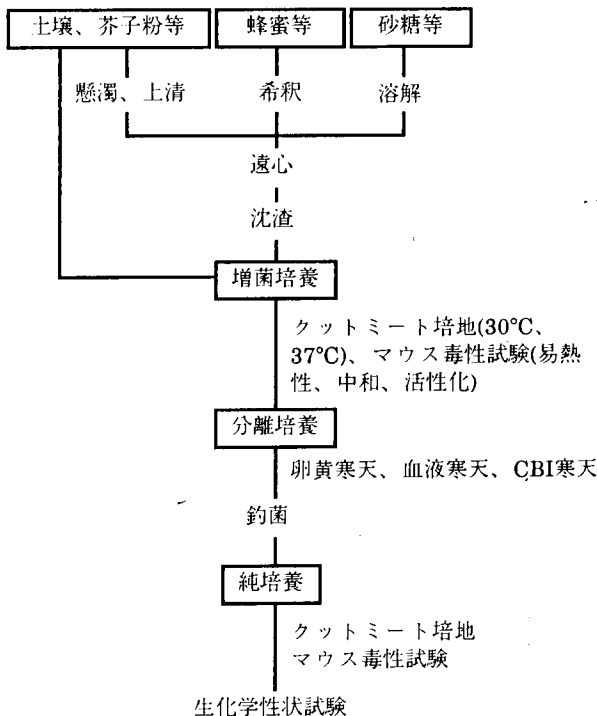


図1 ボツリヌス菌検査の概要

### 3. 増菌培養法と分離培養法

ボツリヌス菌の増菌培養には新鮮な牛肉を用いて作るチョップトミート培地が望ましいですが、現在は市販の乾燥クックトミート培地が広く用いられます。土壌の懸濁液（検体と等量の蒸留水、生理食塩水、またはゼラチン加里ン酸緩衝液、pH 7.0）を数分間静置して大きな粒子を沈殿させ、上澄液の遠心沈渣を増菌培地に接種します（図 1）。この方法では 50～100 g の検体を 1 本の試験管に接種することが可能ですが、雑菌の接種量も多くなります。また、粒子の細かい粘土には用いることは出来ません。その時には、検体を直接増菌培地に接種しますが、培地の量の 10% 位（10 ml の培地に 1 g）が限度です。

試料を接種した増菌培地は無芽胞菌を殺すため 80°C 15～30 分間加熱します。II 群菌芽胞の熱抵抗性は低いので、試料に等量のエチルアルコールを加え、室温に 1 時間静置した後増菌培地に接種します。未知の試料は 80°C 15～30 分、60°C 15 分の加熱処理、および非加熱の 3 種類を増菌培養します。

ボツリヌス菌の発育至適温度は菌群により異なりますので、30°C と 37°C で培養することが望ましいのですが、一温度しか用いない時は 30°C で培養します。II 群菌は多量のガスを産生します。菌の発育が認められると、4, 6, 8, 10 日目、あるいは 4, 7, 10 日目に毒素の試験をします。一度しか試験できない時は 5～7 日目に行います。毒素試験には培養液を 3,000 rpm 10～20 分遠心した上清を用います。培養上清を適当に希釈（5 または 10 倍）したものをマウスの腹腔に注射し、さらに 100°C で 10 分間加熱したもの、および抗毒素血清をあらかじめ注射したマウスを対照に置きます。毒素試験の方法は後述します。

ボツリヌス菌の分離培養は、平板培養あるいは混濁培養法により行われます。培地として血液寒天培地（ツアイスラー）または卵黄寒天（マックラング・トウベ卵黄寒天、GAM 卵黄寒天）が用いられます。増菌培養を寒天平板培地に直接塗抹し嫌氣的に培養します。I 群菌の分離、とくに乳児ボツリヌス症患者の大便の直接塗抹用に、マックラング・トウベ卵黄寒天に

サイクロセリン，スルファメトキサゾールおよびトリメトプリムを添加した CBI 寒天が用いられます。寒天平板は使用前によく乾燥することが必要です。乾燥不十分な場合は集落が互いに融合し，単離を困難にします。培養には厳重な嫌気性が必要です。接種材料は 20～24 時間増菌したものがよい結果を与えます。液体培地に継代培養した時，代を重ねる度に毒力が高くなる場合には分離が容易であり，反対に継代培養すると毒力が低くなって来る時には分離が困難です。培養は 24～48 時間が適当です。

嫌気培養法としては嫌気びんに入れて気相を窒素あるいは炭酸ガスで置換する方法，気相中の酸素を化学反応を利用して除く常温触媒法（脱気し水を充填後，市販の常温カタリストで残っている酸素との反応を触媒し，水を形成させる方法），キットとして市販されているガスパック法，ガス噴射法，ワインベルグ法（高層寒天混釈培養），パウチ法（非通気性のプラスチックフィルムで作った袋内での混釈培養）などがあります。II 群菌は混釈培養するとガス産生のため寒天に亀裂を生じ，集落の単離が困難です。

#### 4. 培地・試薬の作成法

##### ① 試薬

##### ゼラチン希釈法

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
蒸留水	1,000 ml

HCl で pH 7.0 に修正（毒素希釈用は pH 6.2）

ゼラチン	2 g
------	-----

高圧滅菌

家兎抗毒素血清 (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, F 型，それぞれ千葉県血清研究所製)

A, B, C<sub>1</sub>, E, F 型血清は 1.0 国際単位 (IU)/ml の濃度で，D 型は 10 IU/ml で用います。抗 C<sub>2</sub> 血清は国際単位がないので原液で使用します。A, B, C<sub>1</sub>, F 型抗毒素 1 IU は約 50,000 マウス ip LD<sub>50</sub>，D, E 型抗毒素 1 IU は約 5,000 マウス ip LD<sub>50</sub> の毒素を中和します。



## ② 培地

チョップトミート培地

挽き肉（赤身）	500 g
蒸留水	1,000 ml
1N NaOH	25 ml

以上を沸騰させ、冷却して濾過します。肉片は生乾きにします。

ペプトン	30 g
酵母エキス	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g

1N NaOH で pH 7.8 に修正し、

ブドウ糖	3 g
可溶性澱粉	2 g

肉片を適宜入れた中試験管に培地を 10 ml ずつ分注し高圧滅菌します。

マックラング・トウベ培地

トリプチケース	40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
NaCl	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0.1 g
ブドウ糖	1 g
寒天	25 g
蒸留水	1,000 ml
pH 7.3~7.4	

高圧滅菌し、60℃ に冷やし、

50% 卵黄懸濁液（生理食塩水）	0.1 容
------------------	-------

CBI 培地

マックラング・トウベ培地に卵黄と共に次の抗生物質を加えます。

サイクロセリン	250 μg/ml
スルファメトキサゾール	76 μg/ml

トリメトプリム

4 µg/ml

## 5. 検出法

寒天培地平板上の集落の所見から、ボツリヌス菌であると決定できるような特徴は認められません。I, II, III 群菌は卵黄反応陰性、リパーゼ陽性ですが、IV 群菌はリパーゼ陰性です。また、乳児ボツリヌス症例から分離され F 型毒素を産生する *C. barati*, E 型毒素を産生する *C. butyricum* もリパーゼ陰性です。

平板培養で発育した独立集落をなるべく多く釣菌し、クックトミート培地に接種し、30°C で培養し、逐次毒素の試験を行います。分離したボツリヌス菌の生物学的性状が表 2 と一致しなくても、菌の同定・型別には毒素の同定が優先します。すなわち、抗毒素血清による中和試験でボツリヌス毒素が証明されれば、生物学的性状は無視しても差し支えありません。

毒素の試験には、15～20 g のマウス 2 匹以上を 1 群とし、次のような 8 群を用意します。

第 1 群には上清をそのまま 0.5 ml ずつ腹腔内に注射します。

第 2 群には上清を 100°C 10 分加熱し、その 0.5 ml を腹腔内に注射します。

第 3 群には予め 0.25 ml (0.5～1 単位/ml) の A 型抗毒素血清を腹腔内に注射しておき、さらに無処理の上清 0.5 ml を注射します。中和反応は、試験管内で適当に希釈した A 型抗毒素血清 (1～2 単位/ml) と、上清を等量混合し、37°C 15 分反応させその 0.5 ml を注射してもよい。

第 4 群は、第 3 群と同じようにして B 型抗毒素血清を使用します。

第 5 群は、同様に C 型 (C<sub>1</sub>) 抗毒素血清を使用します。

第 6 群は、同様に D 型抗毒素血清を使用します。

第 7 群は、同様に E 型抗毒素血清を使用します。

第 8 群は、同様に F 型抗毒素血清を使用します。

いずれの群も 4 日間観察します。第 1 群のマウスがボツリヌス特有の症状 (腹壁の陥凹、呼吸困難) を呈し全部が斃死し、第 2 群と、第 3～8 群の

うち1群のマウスが生残した時、使用した抗毒素の型に相当する毒素が存在することになります。全群マウスが斃死すれば、ボツリヌス以外の耐熱性毒素が存在すると考えられます。第1群のマウスが斃死し、第2群が生残、第3群～第8群のマウスの1群の一部が生残するか、全群が斃死し、しかも特異的症状が観察された場合は、用いた抗毒素血清の力価が十分でないか、A～F型以外の毒素の存在が考えられます。上清をさらに希釈し、試験を繰り返すか、他の型(G型, C<sub>2</sub>)の抗毒素による中和を試みるべきです。

検体の活性化は、全培養液に(菌体に毒素前駆体が存在するので遠心は行わない)に等量の2%トリプシン溶液(結晶トリプシンの場合は0.02%)を混ぜ、pHを6.0に修正し、37°C 30～60分間保ちます。活性化した材料のマウス試験は、遠心上清と同じ方法で行います。

毒素の定量には、静脈内注射法(致死時間の対数と投与した毒素量の対数の間に比例関係が成立する)も用いられます。この方法は、短時間(2～3時間)で定量可能ですが、ボツリヌス毒素以外の毒物が混在する時や毒力が一定レベル以下の場合には使えません。

毒素の検出に免疫反応を応用した逆受身血球凝集試験、二重拡散ゲル内沈降法、ラザオイムノアッセイ、酵素抗体法(ELISA)などが開発されていますが、マウス注射より感度が高い方法はありません。また免疫反応には、高度に精製した毒素と、それに対する抗毒素血清がなければ非特異反応が起こります。しかし、迅速、簡便、活性化不要、多数の試料処理可能などの点で、スクリーニング法としては有用です。

## 6. 土壌調査の例

例1。山川ら(1988)は石川県、山陰地方、北九州地方、対馬、与那国、石垣、宮古島などから266、中国新疆自治区から20の土壌検体を採取して調べました。方法は10gの検体を10本の増菌培地(10mlのチョップトミート・ブドウ糖培地)に分けて接種し、30°C 5日間培養後に毒素試験を行いました。中国の20検体中14検体(70%)からボツリヌス菌が検出され、その内訳は、A型3検体、B型5検体、A+B型4検体、A+C型1検

体、A+F型1検体でした。1本の試験管でA、B両型毒素が検出されたものが1例見られました。土壤中の芽胞数はA型25/g、B型10/gが最高でした。国内の266検体中40検体(15.0%)にボツリヌス菌が検出され、その内訳は、C型30検体、E型10検体で、A型もB型も検出されませんでした。

例2。1976年、我々は琵琶湖から、大阪湾へ注ぐ淀川の河川敷の土壤中のボツリヌス菌を調べました。106検体中46検体(43.6%)がボツリヌス菌陽性で、C型16検体、D型10検体、E型5検体、C+D型7検体、不明(C型かD型か決定できなかったもの)8検体でした。検査法は検体50~100gと等量の0.5%ゼラチン加0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を加えて攪拌し、洗いを遠心し、沈殿を肝タビオン、クックトミート培地、あるいはエッグ・ミート培地に摂取し、30°Cあるいは37°C3~4日培養後に遠心上清の毒素を調べました。また1976年8月から1977年9月まで同一地点で検体を採取し、同じ方法で検出率を調べました。11、12月の検出率は約10%でしたが、2~10月は検出率50%以上で、最高75%でした。

例3。Smith, L.D.S (1979)は米国(アラスカ、ハワイを除く)全州から、約50マイル間隔で260の土壤検体を採取し、1gづつ10本のクックトミート培地に接種し、30°C3~5日間嫌気培養し、培養液を凍結融解し、その0.3mlをマウス腹腔に注射し毒素を調べました。61検体(23.5%)からボツリヌス菌を検出し、その内訳はA型26検体、B型22検体、C型3検体、D型5検体、E型6検体でした。A型菌は西部、B型菌は東部に濃厚に分布し、C型菌は南部に、D型菌は北西部、E型菌は水に関係した場所に見られました。同時に破傷風菌を調べ、49検体(18.8%)から検出しました。

例4。Smith and Young (1980)は英国の土壤174検体を調べ、10検体(5.7%)からボツリヌス菌(すべてB型菌)を検出しました。湖や河川の泥を採取した76地点のうち55地点(72.4%)からボツリヌス菌(B型31地点、C型11地点、D型1地点、E型6地点、B+E型2地点、B+C+E型2地点、型別不能2地点)が検出された成績(Smith and Moryson, 1975)と比較すると有為に低い検出率と云えます。検査法は検体50gを50mlの

リン酸緩衝液, pH 7.0 で洗い, 上清の遠心沈殿を 2 本 (22 ml) のクックトミート培地に接種し, 1 本は 60°C 1 時間加熱, 他の 1 本はそのまま 30°C で 6~8 日培養して毒素を調べました。

## 7. 土壤検査の問題点

① 検体採取の場所。地表から 10~30 cm の土壤を採取したという報告が多いが, 魚を地表で干すような海岸では表面の砂の検出率が高い。

② 接種材料。少量 (1 g) の土壤試料をそのまま増菌培地 (10~25 ml) に接種するか, 50~100 g の土壤試料の洗いの遠心沈殿を増菌培地に接種する方法が用いられています。増菌培地 1 本を用いる時には後者の方がよいと思われませんが, 粒子の細かい粘土には用いることが出来ません。後者は増菌培地の数を増やし感度を上げられますが, 毒素試験に使用するマウスの数も多くなります。どちらが良いかは決着が付いていません。

③ 安全性の評価。土壤の場合より深刻なのは食品 (例えば砂糖, 蜂蜜など) の安全性を評価する場合です。砂糖, 蜂蜜などは増菌培地に加えると, それ自体ボツリヌス菌の増殖を阻害しますから, 溶液の濾過, あるいは遠心が必要です。乳児に与えても安全と云うために必要な検体量は誰も答えることは出来ません。ボツリヌス菌陽性の検体を再検査すると陰性に, 陰性の検体を再検査すると陽性になる (稀に) ことは日常経験しています。

④ 培養温度, 培養時間。同一検体を 37°C で培養すると C 型菌のみ, 30°C, 20°C で培養すると E 型菌が検出されたことが報告されています (Notermans *et al.*, 1979)。低温嗜好性のある E 型菌の検出にはわざわざ 10°C で培養することもあります。増菌培養は 10 日間行い, 毎日毒素を調べ, すべて陰性の時に陰性と結論出来ますが, 現実には手間と費用の点で実行困難です。

⑤ 選択培地。すべてのボツリヌス菌に用いられる選択培地は有りません。CBI 培地は I 群菌の分離はできますが, II 群, III 群菌の増殖は抑制されます。増菌培地に接種する検体量を多くした時にはボツリヌス菌は検出されず, 少量を接種したときのみ検出される例は多くの研究者が経験しています。

⑥ 加熱処理。芽胞を産生するクロストリジウム属菌の増菌，分離培養に用いられる加熱による選択は，菌群によって耐熱性が異なるので条件の設定は困難です。一般に 80℃ 15～30 分の条件が用いられますが，II 群菌芽胞は殆ど死滅します。それで，普通 60℃ 15 分と非加熱の条件も併用します。1922 年，Meyer らは世界中の土壌を調べ，A 型と B 型菌しか検出できなかったのは，明らかに検体の加熱のし過ぎであると考えられています。

⑦ 嫌気性条件。ボツリヌス菌は絶対嫌気性菌と云われていますが，酸素耐性は菌群によって異なります。この面の研究は殆どありません。Meyer はウエルシュ菌<スポロゲネス菌<A 型<B 型<C 型の順に酸素耐性が厳しくなると報告しました。血液寒天培地がよく用いられた理由は血液成分が増殖に必須の栄養を提供するのではなく，血液中の還元物質が嫌気びんの欠陥を補っていたものと思われます。嫌気培養装置が改良されるに従って血液寒天が使用されなくなってきたのは，この間の事情を物語るものと思われます。

空気との接触を遮断する混釈培養法，ロールチューブ法などは優れていますが，これらの方法は，ボツリヌス菌が多数存在する時（患者からの材料など）では成功しますが，雑菌が多数を占める時には分離は困難です。寒天平板の方が少数の集落を釣菌するのは容易ですが，1 平板の集落数が 300 を越えると，その中の 1 個を釣菌するのは困難です。イソグリッドメンブランは 1 枚の平板に 1,600 の集落が生じても疎水性グリッドで分画されているので，ニトロセルロース膜に転写して ELISA で毒素を検出できると，ボツリヌス菌の分離は容易です。

⑧ 増菌培地。以前には，肉や臓器を購入し培地は自作していたものです。このような面倒な方法は好まれなくなり，殆どの培地の作成に市販の乾燥粉末製品が用いられます。均質性の点からは好ましいことです。乾燥粉末は湿らせなければ変質しないと考えられていますが，酸化は嫌気性菌には好ましくありません。製造日と使用期限を考慮して使用したいものです。

## 参考文献

1. Notermans, S., J. Dufrenne and M. van Schothorst (1979) Recovery of *Clostridium botulinum* from mud samples incubated at different temperatures. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **6**, 403-407.
2. Smith, G.R. and A.M. Young (1980) *Clostridium botulinum* in British soil. J. Hyg., Camb., **85**, 271-274.
3. Smith, G.R. and C.J. Moryson (1975) *Clostridium botulinum* in the lakes and water ways of London. J. Hyg., Camb., **75**, 371-379.
4. Smith, L.D.S. (1977) Botulism. C.C. Thomas Publisher, Springfield, Ill.
5. Smith, L.D.S. (1978) The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. Health Lab. Sci., **15**, 74-80.
6. Yamakawa, K., S. Kamiya, S. Nishida, K. Yosimura, H. Yu, D. Lu and S. Nakamura (1988) Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China. Microbiol., Immunol., **32**, 579-587.

### 3. 土壌中の軟腐病菌

菊 本 敏 雄

---

#### 1. 軟腐病菌とは

軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) は腸内細菌科に属する植物病原細菌です。この病原菌はハクサイやダイコンなどアブラナ科の野菜類をはじめ、ニンジン、コンニャク、タマネギ、セロリー、シクラメンなど多数の植物に寄生し、大きな被害を与えます。さらに収穫後のトマトやキュウリ、貯蔵中のジャガイモなどの腐敗もひき起こします。病原菌は通常、これら植物の多肉な貯蔵的組織に生じた傷口から侵入し、病斑を形成します。病変部はアメ色・水浸状を呈し、病名どおり軟化、腐敗してゆきます。これは軟腐病菌の産生するペクチン分解酵素の作用によるものです。病勢は高温多湿な条件下で一層はげしさを増します。

軟腐病菌は土壌中に生息していて、とくに感受性の作物のほかアカザ、ツユクサ、スベリヒユなど、ある種の雑草の根圏でも顕著な増殖を示します。ハクサイの場合、播種後 40 日頃から根圏や地際部の葉圏土壌で急激に増殖し、菌数は乾土 1 グラム当たり  $10^6 \sim 10^7$  のレベルに達します<sup>1)</sup>。そして、ちょうどこの時期に、ハクサイの地際部附近から軟腐病の発生が見られるようになります。このように、発病に先だって病原菌の増殖が起こります。ハクサイ軟腐病は土壌伝染性の重要病害の 1 つに数えられています。



## 2. 土壤中における軟腐病菌の検索

1950年、津山らは軟腐病菌の土壤中における生態の研究をはじめるにあたり、本菌の検出・定量法として2つの手法、すなわちニンジン円盤法<sup>2)</sup>とKauffmanによる変法ドリガルスキー培地<sup>3)</sup>を採用しています。

### 1) ニンジン円板法

植物病原菌が特定の植物に寄生する性質に着目し、病原菌に感受性の植物あるいはその一部分をエサ(bait)にして、目的とする病原菌を選択的に検出する試みは古くから行われてきました<sup>4)</sup>。感受性植物のなかから、一年を通して比較的入手しやすいニンジンが選ばれたのです。

まず、表面殺菌を行ったニンジンから、無菌的に厚さ0.5 cmの円板をつくります。土壌希釈液の一定量を円板の切口上面に接種し、温室中で25～30℃ 2～4日間培養して、腐敗の有無を調査します<sup>5)</sup>。ニンジン円板法は原理的にはMPN法(希釈頻度法)と同じです。

さて、津山はジャガイモとハクサイとの輪作圃場の、畝上株間の表面から5 cmの深さの土壌について、4月から翌年10月まで定期的に調べました。その結果、ニンジンの腐敗率は時期的に大きく変動し、作物の成熟期にあたる6月と9月、10月に高い値がえられました。このように、ニンジン円板法の利用により、初めて土壤中における軟腐病菌の季節的消長という、大変興味深い現象がクローズアップされたのです<sup>2)</sup>。

### 2) ニンジン円板法の問題点

土壌中には*Erwinia*属の軟腐病菌グループの他にも、ニンジンやジャガイモを腐敗させる*Pseudomonas*属および*Bacillus*属に属する数種の腐敗性細菌が生息しています<sup>6)</sup>。したがって、この種の実験においては、発生した腐敗がたしかに目的の菌によるものであるとの確認が必要になります。また、使用した実験材料が、すでに軟腐病菌によって汚染されていることも間々あるのです。常に、新鮮な材料を使用することは、こうした汚染を最少限に抑えるだけでなく、病原菌に対する感受性の面でも優れております。ちなみに、新鮮なニンジン円板に $10^1$ オーダーの軟腐病菌を接種すると、腐敗率は60～100%に達します。さらに、新鮮なハクサイの感受性は

ニンジンより、10 倍も高いのです。このように感受性植物の生組織の利用により、試料中に存在する 1 個の病原菌を検出することも、それほど困難ではないのです<sup>5)</sup>。その際、軟腐病菌による腐敗の発生に適した環境条件の設定が重要です<sup>5)</sup>。しかし、この方法の最大の難点は先にもふれたように、腐敗性細菌による実験材料の自然汚染という問題です。表面殺菌で、これらの汚染菌を完全に除去することは望めません。そのため実験結果にはいつでも？マークが付いてまわります。もし、無菌栽培をしたニンジンやハクサイが入手できるようになれば、この問題は一挙に解決されましょう。

### 3) ハクサイ栽培による軟腐病菌の検出

畑にハクサイを播種し、変法ドリガルスキー培地を用いた希釈平板法により、根圏や地際部の葉圏土壤中における軟腐病菌の動態を経時的に調査しました。その結果、播種後 40 日を経過する頃から軟腐病菌が急激な増殖を示すことは既述の通りです。軟腐病菌の菌数は乾土 1 グラム当り  $10^6 \sim 10^7$  のレベルに達し、色素耐性細菌数の数パーセント、場合によっては 10 パーセントを越えることさえあるのです。このように、ハクサイは土壤中における軟腐病菌の選択的な増殖を惹起する、素晴らしい機能を備えています。現在、これに匹敵する増菌法は見当りません。

東北大学片平キャンパス内にある軟腐病の常発畑に、雑草の生育と外部からの軟腐病菌の侵入を防ぐ目的で、シルバーポリトウを被覆して、5 年間休閑しました。この畑にビニールハウスを建て、その中でハクサイを栽培したところ、軟腐病が激発しました。その発病株から分離した病原細菌は、すべて軟腐病菌と同定されました。この結果から、軟腐病菌はきわめて腐生能力の高い植物病原細菌であることが明らかになりました。

## 3. 土壤中における軟腐病菌の生活

軟腐病菌は植物の生えていない畑の土のなかで、少なくとも 5 年間生存することは、休閑畑に感受性作物を栽培する方法で解明されました。しかし、本菌の土壤中における生活の実態については、不明の点が多く残されています。

## 1) 変法ドリガルスキー培地

この培地の組成は普通寒天培地に乳糖，クリスタル紫および B.T.B. を加えた簡単なものです<sup>3)</sup>。本培地の特質はグラム陽性細菌の生育の抑制と，乳糖からの酸の生成にともなう黄色コロニーの形成の，2 点にあります。

流し込みを終えた平板は 28°C で 2 日間培養し，黄変したコロニーをマークし，翌日もう一度チェックします。これは，黄変の遅いコロニー，小さいものや再び青変するなどして，軟腐病菌が見落されるのを防ぐ意味があります。このように，黄色コロニーの出現はかなり不安定な性状である点に注意を要します。黄色コロニーの出現とその持続は，発生するコロニーの密度に著しく影響されるため，通常コロニー数が 300 個以下になるように調整します。出来れば，前後数段階の希釈液を調製し，各希釈液を 3～5 枚のペトリ皿に流し込んでおくとう安心です。平板の表面に形成された黄色い，円形のコロニーをルーペで覗くと魚のウロコ状の模様が見えます。この形状は軟腐病菌を鑑別する重要な形質です。一方，培地の内部に形成されると黄色い凸レンズ状を呈します。よく見ると縦横に走った紋様が認められます。流し込む培地の量を 6～7 ml/シャーレ (径 9 cm) と，少なめにすれば表面に形成されるコロニーの割合が増し，それだけ判別が容易になります。ところが大腸菌も同様の形状を示すため，平板上で見分けることはできません。幸いなことに，他にこのような性状を示す細菌が土壤から検出されることは，ごく稀なのです。まれな例として，*Erwinia herbicola* グループの細菌を挙げることができます。

## 2) 病原性 (腐敗力) のテスト

変法ドリガルスキー平板上に形成される軟腐病菌のコロニーの性状は，菌株により多少の差異がみられます。ですから多くのコロニーの顔を観察し，馴れ親しむことが肝心です。そうすれば，90 パーセント以上の確度でコロニーを見分けることが出来るようになります。実験の目的によっては，さらに高い精度が要求されることもあります。その時は病原性テストを行います。

いま調べようとするコロニーを，滅菌したツマヨウジか針の先端になすり付け，表面殺菌をした新鮮なハクサイの中肋片に，数 mm の深さに突き

さして接種します。その中肋片がほどよく入る程度のポリ袋にいれ、輪ゴムで口を封じ、25～30℃で培養します。15～20時間後には、接種部位を中心に水浸状の病斑が形成されます。場合によっては、スラントに植菌しておき、新鮮なハクサイが入手できる時にまとめて腐敗テストを行ってもよいのです。

### 3) 土壌中における軟腐病菌の季節的消長

播種40日を経過し、結球期に入ったハクサイの地際部の葉圏土壌では、品種や個体の区別なく、一斉に軟腐病菌の急激な増殖が起こります。ニンジン円板法でも、ジャガイモやハクサイの成熟期には腐敗率も上昇し、病原菌の季節的な変動が示唆されました。それでは、植物は土壌中における軟腐病菌の季節的な変動とどのような関わりをもつのでしょうか。

ハクサイ軟腐病の常発畑に、ハクサイを周年にわたり栽培しました。結球期に達したハクサイの根圏と葉圏土壌を定期的に採取し、変法ドリガルスキー培地を用い希釈平板法により、軟腐病菌数を測定しました<sup>7)</sup>。

図1でみるように、軟腐病菌は5月下旬から11月中旬のほぼ6カ月にわたって検出され、菌数は乾土1グラム当たり $10^5 \sim 10^7$ のレベルです。本菌がこのように高い密度で生息している部位は、明らかにハクサイの根系や外葉の接触した土壌に限られ、直接植物体の影響の及ばないうね間の土壌

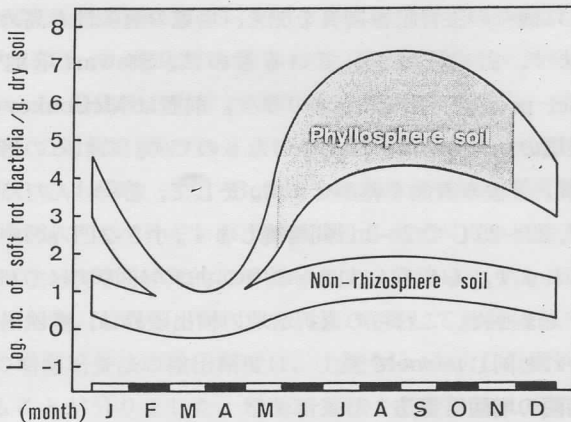


図1 土壌中における軟腐病菌の季節的変動

からは全く検出されません。軟腐病菌は植物から栄養源を摂取して増殖し、高い密度を持続しているのです。言いかえれば、軟腐病菌は野外で植物に依存しないで、高い密度を維持することはできないのです。一方、栄養条件が満たされていても気温（地温）が低下すると、軟腐病菌は検出できなくなりました。このように自然の生態系で、軟腐病菌が増殖し、高い密度を維持するためには、栄養と温度の2つの要因が同時に充足される必要があるのです。

#### 4) 選択培地とその検出限界

津山らが軟腐病菌の検出・定量に変法ドリガルスキー培地を使用して以来、わが国ではこの培地が最もよく使われています。それは、この培地が安価で、調製や使用が簡単、保存がきき軟腐病菌に対する阻害作用がなく、しかも検出精度は他の選択培地に劣らないなどの理由が挙げられます。さて、本培地の検出限界は、平板上に形成されるコロニー（色素耐性菌）数の0.1～0.5%が経験的に想定されます。これを土壤に当てはめれば $10^3 \sim 10^4$  CFU/g 乾土、となります。但し、後述のように風乾などの処理により、色素耐性細菌群の大半を除去した土壤を使用した場合には、 $10^1 \sim 10^2$  CFU/g 乾土の検出も可能です。

ヨーロッパやアメリカでは、軟腐病菌の産生するペクチン分解酵素に着目した培地がいろいろ考案されています。ペクチンやペクチン酸塩を炭素源とし、これに種々の生育阻害物質を加え、培地の選択性を高める工夫がなされています。広く利用されているものに、Stewart 培地<sup>8)</sup>とCVP (crystal violet-pectate) 培地<sup>9)</sup>があります。前者は McConkey 培地の上にペクチン酸塩のゲルを重層、固化させたものです。これらの培地は使用前に1～2日間、平板の表面を乾かせます。そして、希釈けんたく液を平板の全面に広げ、22～25℃で2～3日間培養します。小さな凹みの中心にコロニーが観察されます。もちろん、凹みの中のコロニーのすべてが軟腐病菌であるとは言えません。これらの選択培地の検出限界は、変法ドリガルスキー培地のそれと同じレベルです。

#### 5) 軟腐病菌の増菌培養法

軟腐病菌の土壤中での越冬については長い間、肯定と否定の両派に意見

が分れています。その最大の原因は、使用した検出法の精度にあります。前項でみたように、選択培地を用いた希釈平板法では、通常  $10^3$  CFU/g 乾土以下の検出はできません。ところが、野外における軟腐病菌の生息密度は、ある種の植物の根圏土壌を除けば、この検出限界よりさらに低いレベルなのです（図1参照）。

軟腐病菌を殺菌土壌で7日間培養し、この土壌を約33gずつナイロン製ストッキングの布で包み、12月13日に圃場の表面から3, 10, 20, 30および50cmの深さに埋めました<sup>10)</sup>。埋没時の菌数は  $6.6 \times 10^7$  CFU/g 乾土です。埋没後、凍結と融解の繰り返えされた表層3cmの部位では、軟腐病菌が急速に減少し、1カ月後には  $10^2$  のオーダーまで低下しました。これに対し、10~50cmのより深い層位では、いずれも  $10^6$  のレベルを保っています。埋没2カ月後、表層3cmの土壌から軟腐病菌は、希釈平板法では検出できなくなりました。そこで、変法ドリガルスキー液体培地に、25~30°C 24時間静置培養を行い増菌を図りました。この方法で、3カ月後の表層3cmの土壌からも軟腐病菌が回収されました。しかし、埋没4カ月になると、この増菌培養でも表層土壌については、検出できなくなったのです。

Meneley & Stanghellini<sup>11)</sup> らは、つぎのような組成の増菌培地を発表しました。蒸留水 225 ml, Na-ポリペクティン 0.625 g, 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 ml, 10%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5 ml, 5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 ml これにサンプルの土壌 25 g を加え、250 ml 容エレンマイエル・フラスコを使用して、嫌氣的に室温（約25°C）で48時間培養します。嫌気培養はペクチン物質資化性 *Pseudomonas* 属細菌の生育を抑制する目的があります。谷井<sup>12)</sup> はこの方法を改変して増菌培養を行い、0.1~0.2 CFU/g 乾土の検出が可能であることを報告しています。一方、Butler<sup>13)</sup> は非常に単純な増菌培養法を考案しました。0.5% アスパラギンの水溶液 40 ml をビーカーに注ぎ、これに土壌を加え28°C, 48時間好氣的に培養します。常法により、この培養液の0.1 ml を選択培地（CVP）平板上に広げ、培養して軟腐病菌を計数します。Butler の増菌培養法の検出精度は、上記 Meneley らの嫌氣的な増菌培養法に勝ることが分かりました。増菌培養法を MPN 法に適用することにより、低密度で存在する軟腐病菌の定量化が期待されます。

## 6) 土壤団粒における分布

仙台地方の畑の表層土で軟腐病菌が越冬する可能性は低いようです。しかし、10 cm より下層では植物が生育を開始する春まで生存しています。津山<sup>2)</sup>は畑の深さ 70 cm の土壤から軟腐病菌を分離しました。内生孢子のような明確な耐久器官をつくらない軟腐病菌が土壤中のどこで、どのように生きているのか？ これについては全く分かりません。そうした研究への一歩として、服部<sup>14)</sup>の考案した「洗浄—音波法」を応用し、ハクサイの葉圏土壤における軟腐病菌の存在様式の解析を試みました。

表1でみるように、軟腐病菌の細胞の93パーセントが土壤団粒の外部に分布しております。さらに、洗浄過程でみられる菌数の大きな変動から、本菌が団粒の外部で偏在していることも示唆されました(図2)。また、46個の団粒(2.00~0.84 mm, 1.5 mg)を調べたところ、29個から軟腐病菌が検出され、その菌数は数個から数千個でした(表1中の実験Iと同じサンプル)<sup>15)</sup>。

それでは、しばらくハクサイの根元に降りて、軟腐病菌を含む微生物たちの演ずる壮大なドラマ的一幕を鑑賞しようではありませんか。『そこは暗くて湿度も高い。温度計はほどよく20℃を指しています。地番はかすんで見えない。突然、大きな白いハクサイの根が伸びてきて、甘酸っぱい液体の分泌をはじめます。深い眠からさめた軟腐病菌は、味に覚えのあるこの

表1 土壤団粒中における軟腐病菌の生息部位

	反復 実験	全細菌	色素耐性菌	軟腐病菌	放線菌	糸状菌
CFU/g (乾土)	I	×10 <sup>6</sup> 157.9	×10 <sup>5</sup> 261.8	×10 <sup>4</sup> 54.0	×10 <sup>4</sup> 381.6	×10 <sup>3</sup> 361.5
	II	233.6	615.4	669.1	426.5	372.9
団粒外部 (%)	I	30	45	93	42	57
	II	30	43	93	30	58
団粒内部 (%)	I	70	55	7	58	43
	II	66	57	7	70	42

ハクサイの葉圏土壤より採取した団粒(2.00~0.84 mm)を使用した。

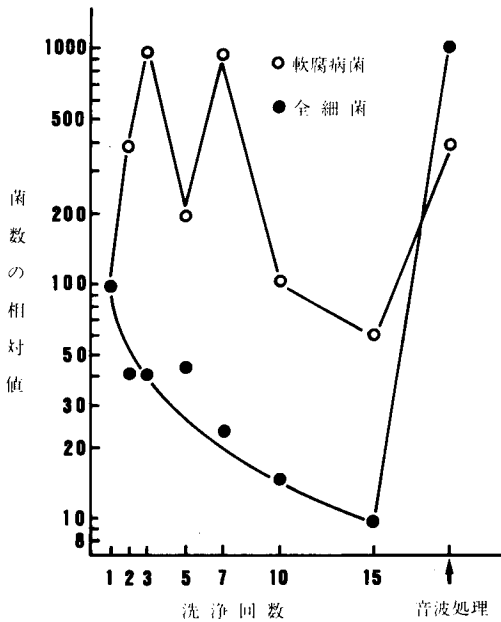


図2 土壌団粒における軟腐病菌の分布の洗浄—音波法による解析

液体を貪るように吸収し、分裂をくり返し、仲間をふやします。周りにも、いろいろな連中がいて、なにやらしきりに活動しています。人一倍、内弁慶な軟腐病菌が集って旅行の相談をはじめます。予定通り、小雨の日の出発と決りました。根の表面の水たまりをたどりながら、上へ上へと登ります。数日後、直径1 cm 以上もある根元にたどり着きました。どうやら外は秋の気配です。この附近一帯は日陰で、何時でもじめじめしていて、自由に泳げまわれます。大小さまざまな穴のある土塊が一面に広がっています。そして、穴の奥から賑やかな話し声が聞えてきます。でも軟腐病菌には分りません。やっとの思いで、誰もいない、浅くて小さい穴が見つかりました。溜っていた水を口にした途端、味のとりこになりました。pH は 6.5, とっても壮快です。数日後には、もう身動きができないくらい新しい仲間がふえました。実は、軟腐病菌の大半は雑居生活を強いられているらしいのです。ここの住人の多くはグラム陰性菌ですが、陽気で活動的な連中な



のです。軟腐病菌の居住区はほぼ円形で、直径は 100 mm を越えますが深さは 5 mm ほどです。この区域へはハクサイの地上部から根圏の何倍もの栄養分が分泌されるため、微生物の生息密度は周りの数百倍も高くなります。それ故、根圏とは区別して葉圏土壌と呼ばれています。

晴れた日の朝、ハクサイの収穫がはじまりました。たちまち栄養分の供給はストップし、土は白く乾きはじめます。そして、軟腐病菌は天国から地獄への途をたどることになります。幸か不幸か、大粒の雨が降り、軟腐病菌は思い思いに、この場を去って行きます。』

一週間後、ここに来て軟腐病菌を探しました。もう、希釈平板法では検出できないことが分りました。

## 7) 蛍光抗体法

圃場から採取した新鮮な土壌に、培養した軟腐病菌を大量 ( $10^8$  CFU/g 乾土) に導入し、室温におきます。3 日後には  $10^4$  以下のレベルに低下し、希釈平板法で検出できなくなります。ところが、この土壌を十分風乾して軟腐病菌を導入した場合、2 日後にピークを形成し、その後緩やかに減少します<sup>10)</sup>。エスロンパイプ (10×5 cm) の一端をナイロン製ストッキングで底を作り、160 g の風乾土壌を入れ、圃場に深さ 9 cm に埋めます。これに 100 ml の軟腐病菌のけんだく液 ( $5.3 \times 10^8$  /ml) を加えます。表面殺菌をして、一夜 25°C で催芽させた 22 種の植物の種子を、それぞれエスロンパイプにまきます。一週間以内に、すべての植物が発芽しました。一方、導入 10 日後の軟腐病菌数は  $9.5 \times 10^5$  CFU/g 乾土で、なお高いレベルにあります。1 カ月後から 4 回、変法ドリガルスキー培地を用いた希釈平板法と蛍光抗体法により、供試植物の根圏から軟腐病菌の検出・定量を試みました。

希釈平板法で検出された植物はハクサイ、キュウリ、アサガオの 3 種です。しかも、実際に検出されたのはハクサイが 4 回の調査中 1 回、キュウリは 3 回中 1 回なのです。他方、蛍光抗体法ではハクサイのほか 7 種の植物から本菌が検出できました<sup>16)</sup>。これに対し、植物を植えなかった対照土壌からは、この調査期間中  $5.0 \sim 5.6 \times 10^2$  CFU/g 乾土の軟腐病菌がコンスタントに検出されました。この結果は導入した軟腐病菌が、根圏に定着し増

表2 軟腐病菌の検出・定量法

実験法	検出限界	備 考
植物生組織法	1~10 CFU/0.2 ml	ニンジン、ハクサイ、ジャガイモなど、ある程度の特異性あり。MPN 法を応用すれば定量可能。材料の自然汚染に注意。
希釈平板法	$10^3 \sim 10^4$ CFU/g (乾土)	変法ドリガルスキー培地、Stewart 培地、CVP 培地など。選択性は高くない。菌数が多い試料では定量は簡単。
増菌培養法	0.1~1 CFU/g (乾土)	選択性は高くないが、増菌に期待。MPN 法を応用すれば定量可能。
蛍光抗体法	1 CFU/0.02 ml	高い特異性あり、タイプの異なる軟腐病菌は検出不能。工夫すれば定量も可能。
ファージ法	$10^2$ CFU/g (乾土)	高い特異性あり、タイプの異なる軟腐病菌の検出不能。定量可能。
バクテリオシン法	$10^3 \sim 10^4$ CFU/g (乾土)	高い特異性あり、タイプの異なる軟腐病菌の検出不能。定量可能。
PCR 法	1 分子/100 $\mu$ l(理論値)	遺伝子レベルの検出が可能、高い特異性。実験機器が高価? (100 万円以上)。

殖するどころか、逆に植物の生育にともなって、新たに成立したマイクロフローラにより、排除されることを示しているのです。但し、無菌的に育てたこれら植物の根圏に導入した場合は、いずれも増殖が促進されます<sup>1)</sup>。したがって、圃場において、ある植物の根圏で軟腐病菌が選択的に増殖するという現象には、植物と軟腐病菌に加え、土壤中のマイクロフローラが深く関与していることに注目する必要があります。

さて、軟腐病菌の検出に利用した蛍光抗体法は、塗抹法とマイクロコロニー法に分れます。前者は根圏試料をペクチン培地などで増菌培養を行います。その培養を直接か、遠心器で集菌したものをカバーガラスに塗抹して標本を作ります。後者は増菌培養を  $10^{-3} \sim 10^{-4}$  に希釈し、その 0.02 ml をあらかじめ乾かしてある選択培地の平板上に滴下し、30°C で 6~8 時間培養します。その上にカバーガラスをのせ、発生したマイクロコロニーの印画標本をつくります。また、ハクサイ葉面上のマイクロフローラに印画法を適用すれば、生態的な知見がえられます<sup>17)</sup>。蛍光抗体法は抗原抗体反応という特異性の高い反応に基づくもので、これまでの方法では得難い高い選択性がえら

れます。その反面、軟腐病菌でも血清型が異なれば検出できないという欠点もあります。マイクロコロニー法を応用すれば、サンプル (0.02 ml) 中に1個の軟腐病菌が存在すれば容易に検出できます。それ故、蛍光抗体法の検出限界は、前処理でいかに軟腐病菌を増菌できるかにかかります<sup>17)</sup>。

#### 4. おわりに

これまで利用されてきた軟腐病菌の検出・定量法と、それによって明らかになった生態的知見の概略を紹介しました。なおファージ法<sup>18)</sup>は次章で詳述されますので省略します。ここでは、仮にバクテリオシン法<sup>19)</sup>としておきますが、この方法の利用も1つ考えられます。それは軟腐病菌の被検試料を選択培地の平板上で培養しておき、バクテリオシン感受性の軟腐病菌を指示菌として重層するのです。そして、形成されたプラークを計数します。組換え微生物の生態系におけるモニタリングについては、組換え体と同時に組換え遺伝子の挙動についても追跡する必要があります。こうした観点から、軟腐病菌の pectate lyase 遺伝子の一部を利用した PCR 法の応用について検討しています。PCR 法を含め、軟腐病菌の検出・定量法の特徴などを表2にまとめてみました。

検出・定量法の真価が問われるのは、低密度で存在する試料を扱う場合です。その際、被検試料に対し、つぎに示すようないくつかの処理を行う必要があります。① 分散、② 増菌、③ 濃縮、④ 計数化、⑤ 確認。これらの処理は検出だけでよいのか、定量も行うのか、と言った実験の目的や利用する実験方法によっても、当然異なります。例えば、雨滴などでは最初に遠沈して濃縮する必要があるでしょうし、MPN 法を採用すれば、計数化と増菌とを同時に行うことになるでしょう。要は、実験の目的に合わせて、いくつかの方法を組み合わせ、それぞれの方法がもつ長所を生かすように工夫することが賢明です。

#### 参考文献

- 1) T. Kikumoto: Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ., **31**, 19 (1980).
- 2) 津山博之: 東北大農研彙, **13**, 221 (1962).

- 3) 伝染病研究所学友会：細菌学実習提要，丸善，P. 68 (1958).
- 4) R.D. Durbin：Bot. Rev., **27**, 522 (1961).
- 5) 菊本敏雄，坂本正幸：東北大農研報，**20**, 37 (1968).
- 6) D.C. Graham：Nature, **181**, 61 (1958).
- 7) 菊本敏雄：東北大農研報，**25**, 125 (1974).
- 8) D.J. Stewart：Nature, **195**, 1023 (1962).
- 9) D. Cuppels & A. Kelman：Phytopathology, **64**, 468 (1974).
- 10) 菊本敏雄，坂本正幸：東北大農研報，**23**, 159 (1972).
- 11) J.C. Meneley & M.E. Stanghellini：Phytopathology, **66**, 367 (1976).
- 12) 谷井昭夫：北海道立農試報，**45**, 1 (1984).
- 13) L.D. Butler：Ph.D. Thesis, Univ. of Arizona, 65 (1980).
- 14) 服部 勉：土肥誌，**37**, 302 (1966).
- 15) 菊本敏雄，坂本正幸：日植病報，**36**, 207, (1970).
- 16) 菊本敏雄，坂本正幸：日植病報，**35**, 29, (1969).
- 17) 菊本敏雄，坂本正幸：日植病報，**33**, 181, (1967).
- 18) Y. Suzuki & J. Togashi：Phytopath. Z., **93**, 137 (1978).
- 19) W.Y. Chen & E. Echandi：Phytopathology, **72**, 310 (1982).



## 4. 土壌中の軟腐病菌のファージ 特異性

富 樫 二 郎

---

### 1. はじめに

ハクサイ、ダイコンなどの野菜類に発生し、時々致命的被害をもたらす病気の一つに軟腐病があります。この病気ははじめ地際部に水浸状の病斑が形成され、最後には軟腐症状が全身に進展するもので典型的な土壌病害です。病原菌は *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* で腸内細菌科、*Erwinia* 属の soft rot 群の一種です<sup>13)</sup>。また、本菌はグラム陰性の桿菌で耕地、未耕地を問わず、広く土壌中に生息しています。栄養要求は単統でグルコース、アンモニヤ、無機塩類を含む培地で増殖でき、耐久器官の芽胞は作りませんが、土壌には約 40 ケ月以上もの期間腐生的に生存できます<sup>21)</sup>。野菜類が栽培されますとその根圏土壌で特異的に増殖し、これが感染源となって軟腐病をひきおこします<sup>7)</sup>。本病は今日でもウイルス病、根こぶ病と共に防除が非常に困難な病気として恐れられています。

これまで土壌中の軟腐病菌の検出・定量法として選択培地による希釈平板法<sup>21)</sup>、ニンジン円盤生組織を用いる方法<sup>21)</sup>、蛍光抗体法<sup>6)</sup> およびファージ法<sup>14,16)</sup> があります。ここではその中のファージ法について紹介し、若干の問題点を指摘したいと思います。

### 2. ファージによる土壌中の軟腐病菌の検出

ファージは細菌に寄生するウイルスのことで感受性菌の生細胞の中での

み特異的に増殖する性質があります。このようなファージの発見の歴史は古く、1917年イギリスの F.W. Twort が球菌のコロニーの中に光って透明な部分を観察したのが最初といわれております。今日これは溶菌斑と呼ばれるものですが、当時は透明変換といっていました。1917年 F. d'Herelle は赤痢菌で目に見えない微生物性の拮抗物を見出し、バクテリオファージと命名しました。Twort と d'Herelle の発見は同一のものであり、広く Twort-d'Herelle 現象として知られています。1933年 M. Schlesinger はファージが核酸とたんぱく質から構成されていることを明らかにし、1939年 M. Delbrück らはファージの増殖に関する一段増殖実験法を確立し、ファージについての本格的な実験が開始されました<sup>15)</sup>。

植物病原菌では 1925年アメリカミシガン大学の G.H. Coons らが野菜類軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、ジャガイモ黒脚病菌 (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*) 根頭がんしゅ病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) を溶菌するファージ (transmissible lytic principle) の存在を証明しました<sup>1)</sup>。これまで5属31種の植物病原菌でファージが分離されており、いずれも種または系統特異性を示すため、病原菌の分類、同定、検出・定量、および病気の発生予察などの手段に用いられ<sup>10)</sup>、植物細菌病学の進歩に大きな貢献をして来ました。それではどうしてファージで土壤中の病原菌を検出できるのでしょうか。それはファージの種または系統特異性を利用したもので、土壤中で他の微生物などと共存している病原菌のみを溶菌するからです。ファージの宿主細菌を溶菌し増殖する過程は、次の通りです。まず、感受性菌が増殖している培地にファージを加えますとその菌体表面に附着します。その後、菌体の細胞壁を溶解し、ファージの核酸部分が体内に侵入します。体内でファージは合成され、やがて細胞は破壊されて多数の新生ファージが放出されます(図1)<sup>8)</sup>。この過程を溶菌感染サイクルといいます。ファージ法はこのサイクルを利用したものにはなりません。

この方法を植物病原菌の検出に導入したのは 1950年カナダの H.M. Katznelson ら<sup>5)</sup>で、この方法によりインゲン種子にかき枯病菌 (*Pseudomonas phaseolicola*) が潜伏しており、種子伝染することを明らか

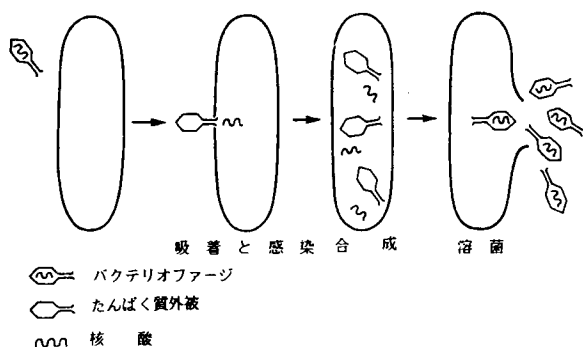


図1 ファージ産生の過程 (Kiraly ら 1970)

にしました。我が国では1954年脇本らによりイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) がイネ罹病葉や種籾で越冬することを証明し<sup>22)</sup>、本病の発生生態上きわめて重要な知見を得たのです。このようなことから、1965年岡部は土壤中の病原菌の検出にもファージ法を導入できることを指摘したのです<sup>11)</sup>が、最近までその具体的な検討はなされていませんでした。

私達が土壤中の軟腐病菌を検出する手順は次のようになります。まず、被検土壌1gを10mlのブイヨン培地に加えます。それに既知の数のファージを加え25°Cで24時間培養します。この間試料中に軟腐病菌が存在していれば溶菌サイクルが繰り返され、ファージ数が増加します。この増加分は培養後試料を遠沈し、その上澄液中のファージ数を溶菌斑計数法で測定して判定します。この時ファージの数がはじめに添加した数より増加していれば、それはとりも直さず試料中の軟腐病菌の体内で増殖したものであり、その土壤中に軟腐病菌が生存していたと判定できます。このようにファージによる病原菌の検出は操作が比較的簡単で、しかも短期間に判定できる利点があります。

ファージ法ではファージ数を正確に測定しなければなりませんが、これには電子顕微鏡による直接観察法があります。しかし、この方法は煩雑で試料の多い場合などは中々困難なので、普通溶菌斑計数法が用いられます。これはファージ粒子に溶菌斑を作らせ、その数を測定するのですが、溶菌



斑形成には種々の要因が関与します。いずれにしても、存在するファージができるだけ多くの溶菌斑を作ることができる条件、換言すれば高い平板効率<sup>20)</sup>が得られるような条件を設定する必要があります。この条件は細菌の種や系統、およびファージの系統にもよりますが、軟腐病菌の場合、平板に使う培地はブイヨン培地で寒天濃度 1.0~1.2%, 培養温度 23~25°C, 指示菌濃度  $10^7 \sim 10^8$  CFU/ml で高い平板効率が得られました。

溶菌斑の大きさや形態も種々の条件で変わりますが、透明な溶菌斑を作るファージを選び、試料を適宜希釈して溶菌斑の数を測定しやすく調整することも誤差を小さくする上で注意しなければなりません。

また、ファージを添加した試料を培養している間当然他の土壤微生物群も増殖し、それにともなって培地の pH の変化、代謝産物の蓄積、土壤粒子へのファージ粒子の吸着などが起こります<sup>16)</sup>。このため、試料中にたとえ感受性菌が存在していても溶菌感染サイクルが進行しなくなり、ファージが増殖しないことがあります。軟腐病菌の場合、とくにこの種の阻害作用はみられませんでした。細菌の種やファージの系統の組合せによっては当然おこる可能性がありますので事前に調査し、対策をたてておく必要があります。

結局、種々の菌数の軟腐病菌を含む土壌 1 g をファージと共に 10 ml のブイヨン培地に加え、25°C, 24 時間培養後のファージの増殖の有無により土壌 1 g あたり  $10^1 \sim 10^2$  の低いレベルの菌数でも検出できることがわかりました<sup>16)</sup>。

また、幼苗期のハクサイ根面(松島交配新六号)に添加した軟腐病菌は、希釈平板法では添加後 7 日までは検出されましたが、それ以降は検出されませんでした。しかし、ファージ法では約 1 ケ月の間検出することができました。さらに軟腐病発病後、病斑から病原菌を分離し、それらのファージ感受性を検定したところ、添加したものと同一であることがわかりました<sup>16)</sup>。このことはハクサイ根面に添加した軟腐病菌は急速に菌数が減少するものの低い菌数で生存しており、軟腐病をひきおこすことができることを示しております。

### 3. 定量化の方法

1 個の細菌細胞に 1 個のファージを感染させ、溶菌感染サイクルを 1 回だけ行わせてファージ粒子数の変動を調べることを一段増殖実験といいます<sup>15,20)</sup>。液体培地で感受性の細菌とそのファージを混合し培養しますと、最初ファージ粒子の数は一定に保たれます(遅滞期)。その後、急速に増加し(上昇期)、やがて一定の値を保つようになります(定常期)。この定常期のファージ粒子数は 1 個の細菌細胞から放出されたもので、平均放出量と呼ばれます。この値は条件が一定であれば、単感染でも多重感染でも細菌の種とファージの系統によって一定ですので、放出された全ファージ粒子数と平均放出量から試料中の菌数を定量できます。この事実から雑菌を含む混合系中のイネ白葉枯病菌の菌数を定量できることが、1956 年脇本らによって報告されました<sup>23)</sup>。

このようなことから、ファージを用いて土壤中の軟腐病菌の定量法を検討しました。この系ではつねに土壤粒子や土壤微生物などが介在し、ファージの溶菌感染サイクルになんらかの影響を及ぼす可能性が考えられましたので、まず土壤 1 g を含む 10 ml のブイヨン培地での一段増殖実験を行いました(図 2)<sup>14)</sup>。ファージはいずれも当研究保存のものですが、ファージ A では遅滞期 43 分、上昇期 55 分、平均放出量は 30 でした。他方、ファージ B は各々 100 分、230 分、52 で軟腐病菌やファージの系統の組合せによって遅滞期や上昇期の長さおよび平均放出量が異なっております。これはまた土壤の種類などによっても違うと思いますので、前もって充分調べてお

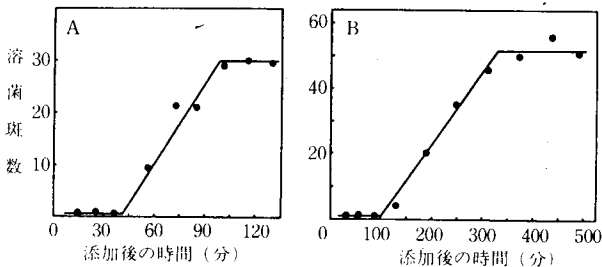


図 2 土壤懸濁液中でのファージの一段増殖実験

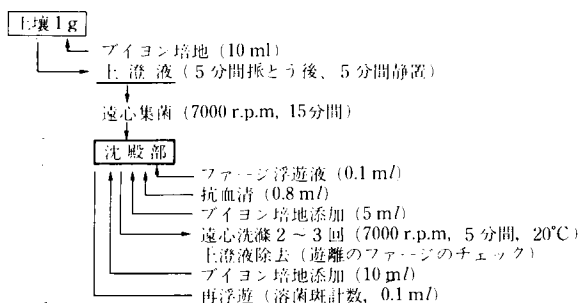


図3 ファージによる軟腐病菌の定量法

く必要があります。つぎに軟腐病菌の菌数を種々かえて土壤に添加し、それらの菌数を図3のような手順でファージ法により定量しました<sup>14)</sup>。この結果、土壌1gあたり $10^2$ のレベルの菌数を含む場合にまで定量できることが明らかとなりました(表1)。これは従来の希釈平板法に比べ、約100倍程度たかい精度をもつといえます。しかしこの検出限界菌数は細菌の種類によっても異なり、タバコ立枯病菌(*Pseudomonas solanacearum*)では $10^3$ であります<sup>12)</sup>。抗ファージ血清の作成など煩雑な点もありますが、確実性、

表1 ファージ法による土壤中の軟腐病菌の検出例 (A 菌)

軟腐病菌数 (土壌 1g あたり)	洗滌液中のファージ数 <sup>1)</sup>		放出総ファージ数 (10 ml あたり)	土壌 1g あたりの 軟腐病菌数
	第1回	第2回		
$2.6 \times 10^4$	0	0	$1.4 \times 10^5$	$2.1 \times 10^4$
	0	0	$1.1 \times 10^5$	$2.3 \times 10^4$
$5.7 \times 10^3$	0	0	$4.4 \times 10^4$	$3.8 \times 10^3$
	0	0	$5.0 \times 10^4$	$4.3 \times 10^3$
$5.7 \times 10^2$	0	0	$8.3 \times 10^3$	$7.1 \times 10^2$
	0	0	$9.5 \times 10^3$	$8.1 \times 10^2$
$1.7 \times 10^1$	0	1	$2.0 \times 10^2$	$< 10^1$
	1	2	$3.0 \times 10^2$	$< 10^1$
無添加	0	2	$2.0 \times 10^2$	$< 10^1$
	0	4	$3.0 \times 10^2$	$< 10^1$

<sup>1)</sup> 0.1 ml あたり

迅速性などの面からファージ法はすぐれた定量法といえます。

#### 4. 軟腐病菌のファージ感受性

これまで既知の軟腐病菌とファージの系統を用いてファージ法の有効性を検討して来ました。ところで軟腐病菌は生理・生化学的性質、血清学的性質およびファージ感受性の差異によっていくつかの系統に類別することができます<sup>13)</sup>。そこでファージ感受性の異なる系統、すなわち種々の溶菌型に分化している軟腐病菌をファージ法ではどの程度検出・定量できるのが問題となります。この辺の事情を探るために、実際のは場における軟腐病菌ファージの宿主範囲とそれらのファージに対する軟腐病菌の感受性を調べることにしました。すなわち、1984年から1986年までの3年間、山形県鶴岡市周辺の畑で各種野菜の罹病組織より病原菌を分離し、それらのファージ感受性を調べました<sup>19)</sup>。鶴岡市周辺ではハクサイ、ダイコンなどの野菜類が集約的に栽培されていますが、軟腐病が発生しその被害は年々増加する傾向があります。これらの病原菌は大部分 *E. carotovora* subsp. *carotovora* と同定されました<sup>18)</sup>。

先ず、1984年5月から10月までの間、同じ地区で分離した軟腐病菌を指

表2 供試のファージと指示菌との反応

指示菌	ファージ										系統
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	B
3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	C
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D
5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	E
6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	F
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	G
8	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	H
9	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	I
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	J

+: 溶菌斑形成      -: 反応なし

示菌として病斑から常法によりファージの分離を行いました。全部で 18 系統のファージを分離しましたが、それらの中から分離源、分離時期および溶菌斑の大きさが異なる 10 系統のファージ (a~j) を供試しました。各ファージとそれらの指示菌 (1~10) との反応は表 2 の通りです。ファージ b はその指示菌 2 の他に 5, 8, 9, ファージ c はその指示菌 3 と 9, ファージ e はその指示菌 5 の他に 8 と 9 とともに反応しました。しかしながら、この他のファージは各々その指示菌との反応にとどまり、高い系統特異性をもつことがわかりました。

つぎにこれらのファージを用いて実際に軟腐病をひきおこしている病原菌のファージ感受性を調べました。1984 年にはハクサイ、ダイコンなど 16 種の野菜の 85 個の病斑から 272 菌株の病原菌を分離しました。その後、供試の 10 系統のファージに対する反応を調べ、系統に類別しました。すなわち、指示菌 1 と同様に反応する菌株群を系統 A と呼ぶことにしました。以下指示菌 2, 3, …10 のように反応する菌株群を各々系統 B, C, …J としました。また、10 系統のファージのいずれかと反応するものの指示菌 1~10 の反応パターンのいずれにも属さない菌株群を系統 K としました。この結果、キャベツ、カリフラワー、ハクサイ、ニラ、タイサイ、レタス、ダイコンおよびカブからの 195 菌株のうち 60 菌株 (30.8%) が供試のファージのいずれかに感受性で、それは全分離菌株 (272 菌株) の 22.0% に相当します。キャベツでは 13 菌株がファージ感受性であり、そのうちの 3 菌株はファージ b, c, g および i と反応し系統 K と判定されました。菌株によって反応するファージは異なるものの、ハクサイ、タイサイ、レタス、カブでも同様の系統がみられ、その数は各々 8, 2, 3, 1 でキャベツの 3 菌株を加えますと合計 17 菌株に達しました。ついで系統 C に属するものが 11 菌株、E が 7, B が 6 菌株の順でした。野菜の種類と系統数との関係では、ハクサイでもっとも多くファージ感受性の 25 菌株が 8 系統に、ついでキャベツで 4 系統に類別されました。他方、ニンジン、カラシナ、ミョウガ、タマネギなど 8 種類の野菜からの 77 菌株にはファージ感受性菌はみられませんでした。なお、キャベツ、カリフラワー、ハクサイおよびカブでは異なる系統の菌株が混在していましたが、ダイコンでは単一の系統の菌株でした (表

表3 1984年に分離した軟腐病菌のファージ感受性による系統類別

分類源作物	分離に用いた 病斑数	分離菌株数	ファージ感受性 菌株数	各系統に属する分離菌株数										
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K <sup>a)</sup>
ハクサ	28	99	25	1	1			4	1	4	2	4	8	
イ														
ツ	9	27	13	1	5	4		3						3
ベ														
ワ	5	13	6										3	
コー														
ダイ	7	21	4			4								
コン														
サイ	3	7	2										2	
イ														
シ	2	5	0											
ナ														
カ	2	6	4											
ラ														
ブ	2	6	4				3							1
ス	3	10	3										3	
レ														
タ														
ソ	2	9	0											
ウ														
ホ	2	6	0											
ウ														
レン	2	6	0											
ソ														
ウ	2	9	0											
モ														
モ	4	9	0											
イ														
モ	6	25	0											
ジ														
ン	2	7	0											
ネ														
ギ	4	12	3						3					
ラ														
ニ	3	8	0											
キ														
ヨ	3	8	0											
ウ														
ガ	3	8	0											
合 計	85	272	60	2	6	11	3	7	1	4	2	4	3	17

a): 系統Kは表1の反応パターンと異なった反応する菌株群

3)。

1985年には15種の野菜の96個の病斑から分離した276菌株のうち、キャベツやニンジンなど12種類の野菜からの119菌株がファージ感受性で、それは全体の43.1%を占めました。そのうち、100菌株がファージgと反応する系統Gに属し、感受性菌全体の84.4%に達しました。ついで系統Iが7、Kが6、Hが4、CおよびDが各々1菌株でした。なお、カリフラワー、ナス、カブからの23菌株にはファージ感受性菌は含まれていませんでした。

さらに1986年にはキャベツなど11種類の野菜の70個の病斑から291菌株の病原菌を分離しました。そのうち112菌株がファージ感受性で全体の38.4%に達しました。これらの中で前年と同様に系統Gに属するものももっとも多く、計83菌株でファージ感受性菌の74.1%を占めていました。ついで系統Cが8、Kが6、Hが5菌株の順でBとEに属するものが各々1菌株でした。野菜の種類別では、この年もハクサイで系統数をもっとも多く50菌株が5系統に類別されました。なお、ニラからの2菌株はいずれもファージに非感受性でした。

以上の結果から野菜類の軟腐病菌はファージ感受性においてきわめて多様性であり、多くの系統、すなわち、溶菌型に類別できることが明らかとなりました<sup>19)</sup>。しかも、ファージ感受性菌の割合や系統の種類や数が年次によって変動しているのです。たとえば、1984年には感受性菌が全体の22.0%で11系統に類別されました。1985年には43.1%で6系統に、さらに1986年には38.4%で8系統に類別されました。また、優占的に出現する系統も年次によって違うのです。したがって軟腐病菌のように多くの系統が含まれている病原菌を特異性のたかいファージで検出・定量する場合には種々の問題がでて来ます。

## 5. ファージ法の問題点

ここでは実際のは場でファージ法によって軟腐病菌を検出・定量する場合の問題点を若干指摘したいと思います。

第1は用いたファージに耐性の系統は、たとえ土壤中に生存して激しく

軟腐病をひきおこすとしても検出・定量から全く除外されてしまうことです。今回の実験のように、たとえ 10 系統のファージを用いても全体の 20～40% の病原菌が検出・定量されるだけで、残りの 60～80 は全く除かれてしまいます。

第 2 の問題点は多犯性のいわゆる宿主範囲の広いファージを分離し、供試することです。軟腐病菌のファージ感受性が多様であることは、ファージの系統特異性が非常にたかいことにもなります。このため、ファージ法で軟腐病菌のような多くの系統に分化している病原菌を検出・定量する場合には、できるだけ宿主範囲の広い多犯性ファージを用いる必要があります。これまでの報告によりますと、ナス科青枯病菌 (*Ps. solanacearum*) や野菜の軟腐病菌 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) では非常に狭いのですが<sup>4)</sup>、カンキツかいよう病菌 (*X. campestris* pv. *citri*) では広いことが知られています<sup>24)</sup>。また、ファージの分離源によっても異なり、一般に今回のように罹病組織からのものは狭く、土壌からのものは多犯性で別の種の細菌にさえ反応する例もあります<sup>2,8)</sup>。今後、軟腐病菌でも宿主範囲の広いファージを分離し、供試することがファージ法の有効性をたかめる上できわめて重要であります。

これとは別に系統特異性のたかいファージをいくつか組合せて供試することが考えられます。しかし、この場合にはファージはその系統によって細菌細胞への吸着、溶菌、溶菌斑形成、平均放出量、不活化温度などの性質がかなり違いますので、供試する前に個々のファージの諸性質を充分調べる必要があります。

第 3 の問題点は実際のほ場における軟腐病菌のファージ感受性の実態を把握することです。同一種の病原菌でも地域や栽培されている作物の種類によってそこに分布する系統が異なることがあります。このようなことから、あるほ場で軟腐病菌をファージ法で検出・定量する場合、そのほ場で軟腐病菌の種や系統を前もって調査することもファージ法の有効性をたかめ、その適応範囲を広げる上でも重要であります。



## 今後の課題 —— まとめにかえて ——

前項でも指摘したように、軟腐病菌は種々の種や系統の集合体であります。ところでナス科青枯病菌 (*Ps. solanacearum*) をそのファージと共に土壌に加えますとファージ耐性菌が出現します。また、ファージ耐性菌は人工培地で自然突然変異によって生じます<sup>10,11)</sup>。一般に細菌は形質転換、形質導入、溶原変換などにより形質が変異することがありますが、軟腐病菌でも土壌や病斑でなんらかの原因でファージ感受性菌が耐性菌に変異したり、逆に耐性菌が感受性菌に変異する可能性が考えられます。それにしてもこのようなファージ感受性の多様性はその病原菌の土壌中での腐生的生存や宿主体での感染能力にいかなる意義、役割をもつもののでしょうか。この方面の知見は非常に少なく、病原菌の変異を含めてその解明が強く要請されています。

著者の一連の実験で軟腐病菌のファージは非常に系統特異性が高いことが明らかにされました。このことはファージ感受性を標識にしてその系統の生態的行動を追跡できる利点があることを示しております。たとえば、軟腐病菌のいくつかの系統をハクサイ中肋組織に混合接種し、病斑の進展過程での系統間の競合関係を調べたところ、共存の系統によって優占的になる系統が異なることが明らかとなりました<sup>17)</sup>。また、カンキツかいよう病菌 (*X. campestris* pv. *citri*) では系統 (溶菌型) によって毎年発病を繰り返しながら生存を続けている寄生的エコタイプと雑草や土壌中で腐生的生存を続ける腐生的エコタイプのある可能性が示唆されています<sup>3)</sup>。このように病原菌の系統 (溶菌型) は単にファージ感受性が異なることにとどまらず、その生態的行動の差異をともなっていることも考えられますので、今後ファージを導入した系統レベルでの新しい分野の研究の展開が期待されております。

## 参考文献

- 1) Coons, G.H. and Kotila J.E. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. *Phytopathology* 15:

- 357-370.
- 2) Goto, M and M.P. Starr (1972). Phage-host relationships of *Xanthomonas citri* compared with those of other Xanthomonades. Ann. Phytopath. Soc Japan 38: 226-248.
- 3) 後藤正夫, 大田光輝, 岡部徳夫(1975). カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson の腐生的生存に関する研究 (第II報) 雑草, ワラおよび土壌中における腐生的生存期間および生存密度について. 日植病報 41: 141-147.
- 4) 後藤正夫 (1981). 新植物細菌病学. ソフトサイエンス社, 東京.
- 5) Katznelson, H. and M.D. Sutton (1951). A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infection of seed. J. Bacteriol. 61: 689-701.
- 6) 菊本敏雄, 坂本正幸(1967). そ菜類軟腐病細菌の生態的研究. 第3報. *Erwinia aroideae* の検出・定量への蛍光抗体法の応用. 日植病報 33: 181-186.
- 7) 菊本敏雄(1968). そ菜類軟腐病細菌の生態的研究. 第5報. ハクサイの生育にともなう根圏マイクロフローラの変動. 坂本教授還暦記念論文集 355-366. 仙台.
- 8) Kiraly, Z., Z. Klement, F. Solymosy and J. Voros (1970). Methods in plant pathology. Akademiai Kiado, Budapest.
- 9) 岸 国平 (1985). 植物防変 39:
- 10) Okabe, N. and M. Goto (1963). Bacteriophages of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 1: 397-418.
- 11) 岡部徳夫 (1965). 土壌中の病原細菌の検出・定量と活性評価. 日植病報 31: 398-400.
- 12) 小野邦明 (1979). タバコ立枯病の生態と防除に関する研究. III. タバコ立枯病菌の検出定量法 第2報. ファージ法によるタバコ立枯病菌の検出と定量. 宇都宮たばこ試験場特報 1: 35-48.
- 13) Perombelon M.C.M. and A. Kelman (1980). Ecology of the soft rot erwinias. Ann. Rev. Phytopath. 18: 361-387.
- 14) Suzuki, Y and J. Togashi (1978). Estimating the number of soft rot bacteria, *Erwinia aroideae*, in soil by bacteriophage. Phytopath. Z., 93: 137-147.
- 15) Stent, G.S. (渡辺格ら訳) (1972). バクテリオファージその分子生物学一. 岩波書店, 東京.
- 16) 富樫二郎(1976). ファージによる土壌中の軟腐病菌の検出法. 山形大学紀要(農学) 7: 347-366.
- 17) 富樫二郎(1979). 植物組織内における軟腐病菌 *Erwinia carotovora* 系統間の競合. 日植病報 45: 591-595.
- 18) Togashi, J. (1988). Identification of the organisms causing soft rot disease in vegetables in the fields of the Tsuruoka district. Bull.

Yamagata Univ., Agr. Sci. 10: 473-478.

- 19) 富樫二郎 (1989). 日植病報投稿中.
- 20) 富沢純 (1970). バクテリオファージの実験. 岩波書店, 東京.
- 21) 津山博之 (1965). 野菜類軟腐病菌の生態と防除. 日植病報 31: 159-164.
- 22) 脇本 哲 (1954). ファージによるイネ白葉枯病菌の生存の検定. 九大農芸誌 14: 495-498.
- 23) 脇本 哲, 吉井 甫 (1955). Bacteriophage による bacteria の定量. 九大農芸学芸誌 15: 161-169.
- 24) Wakimoto, S. (1967). Some characteristics of citrus canker bacteria *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson, and the related phages isolated from Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 33: 301-310.

## 5. 土壌中のセルロース分解菌の分布

山 本 広 基

---

### 1. はじめに —— 土壌中における微生物の分布

土壌中の微生物の活動を理解するためには、土壌環境の物理的、化学的特徴を理解する必要がありますが、土壌中において微生物の活動を支配する因子は、実験室内における培養系に比べるとはるかに複雑です。土壌微生物研究が一般微生物研究と異なる最も主要な点は、後者は均一な環境下に存在する微生物を取り扱うのに対して、前者は土壌という極めて不均一な場における微生物を取り扱わねばならないということです。土壌は、地域によって異なるばかりでなく、同じ母岩から形成された土壌であってもその構造が異なっていたり、また様々な径の粒子の集合体ですからその微細構造も極めて多様で、しかもそれらが不均一に分布しています。これらの物理的要因の他に、微生物の活動に直接影響を及ぼす化学的要因もその場に応じた不均一性を示します。したがって、当然のことながら土壌中における微生物の分布も、微視的にも巨視的にも一様でないことは容易に想像されます。ある実験では、土壌微生物の微視的住み場所として二つのタイプ、すなわち毛管孔隙（団粒内部）と非毛管孔隙（団粒外部）があることが示され、前者は主として細菌、後者は細菌、糸状菌、原生動物などの住み場所として用いられているものと考えられます（図1～3）。また、ある区画の微生物の分布図を描いた試みもあります（図4, 5）。これらのデータは、ある種の微生物の存在するところと存在しないところ、また著しく微

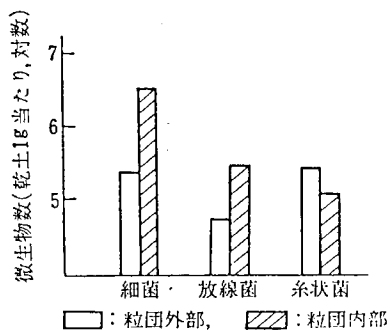


図1 土壤粒団内における細菌、放線菌および糸状菌の分布 (服部 1967)

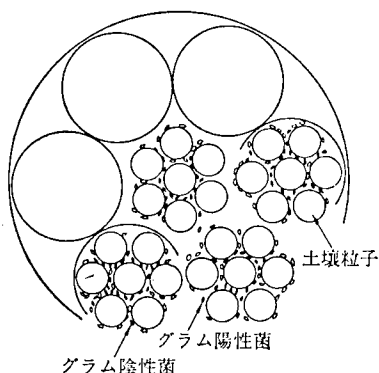


図3 土壤の粒団構造と細菌の分布 (古坂, 服部, 1962)

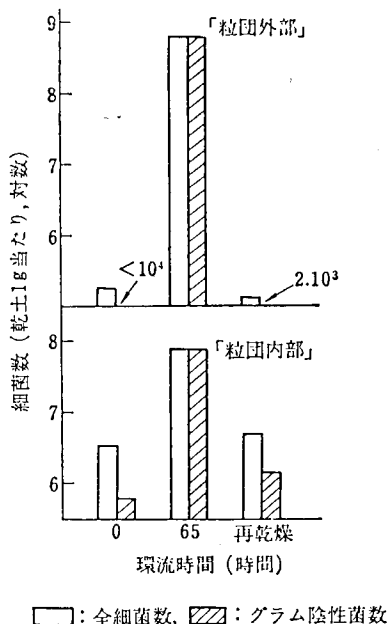


図2 グリシン環流による細菌数の変化 (服部 1967)

生物数の異なる場所が隣接しているなど、分布の不均一性の大きさをよく表わしています。

このような土壤微生物の不均一分布については、これまでよく言われながらも実際の研究例は限られています。ここでは、セルロース分解活性の分布のデータを基に、土壤中における微生物の分布様式について考えてみたいと思います。

## 2. セルロースの微生物分解

土壤中の微生物の多くは、種々の化学変化の担い手となっています。これから述べるセルロース分解をつかさどる微生物も広範な土壤中に存在しているのですが、一般の土壤微生物の場合と同様、土壤という不均一な場における存在様式についてはほとんど明らかにされていません。

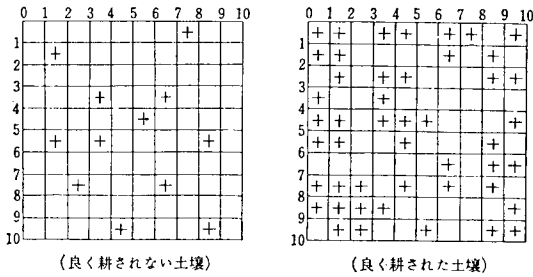


図4 Azotobacter の分布図 (Krasil'nikov)  
1 区画は  $1\text{ m}^2$  当たりの Azotobacter の存在の有無。+ は存在した場合は示す。

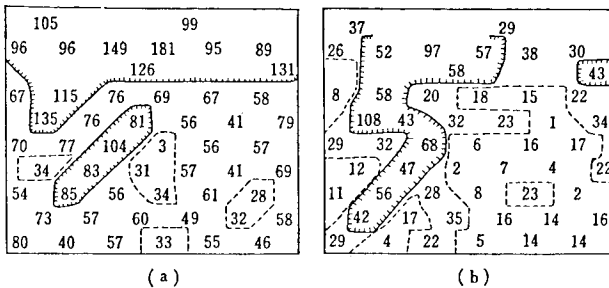


図5 糸状菌の分布図 (服部)  
(a) 全糸状菌, (b) Cladosporium, 数字は各菌数 ( $\times 2.10^2/\text{g}$  土壌) を示す。

セルロースは、高等植物の主要な構成成分であり、また自然界に存在する、おそらく最も多い有機炭素化合物であると考えられています。これら植物の大部分は、いずれ土壌中に入ることになるので、土壌中におけるセルロースの分解は地球上の炭素循環に特別の意味を持っています。それ故、この物質の分解にたずさわる微生物に対しては大きな関心が寄せられてきました。

セルロースは、グルコースが  $1, 4\text{-}\beta$  結合した多糖類で、前述のように高等植物の他、藻類や多くの菌類の細胞壁成分の一部であり、また土壌有機物中にも見い出されています。デンプンも同じくグルコースから成る多糖類ですが、こちらは  $1, 4\text{-}\alpha$  結合あるいは  $1, 6\text{-}\alpha$  結合したもので、微生物

表1 セルロールを利用することのできる微生物の属名  
(ALEXANDER, 1977)

糸状菌	細菌	放線菌
<i>Alternaria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Coprinus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptosporangium</i>
<i>Fomes</i>	<i>Cytophaga</i>	
<i>Fusarium</i>	<i>Polyangium</i>	
<i>Myrothecium</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Penicillium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	
<i>Polyporus</i>	<i>Vibrio</i>	
<i>Rhizoctonia</i>		
<i>Rhizopus</i>		
<i>Trametes</i>		
<i>Trichoderma</i>		
<i>Trichothecium</i>		
<i>Verticillium</i>		
<i>Zygorhynchus</i>		

ALEXANDER, M. Microbiology of Cellulose, in Introduction of Soil Microbiology 2nd ed., John Wiley & Sons, New York (1977)

による生分解性はセルロースに比べるとはるかに速かです。当然、これらの構造のちがう物質は異なる微生物群を刺激することになります。表1に掲げるような多種多様な微生物がセルロースを炭素源、エネルギー源として利用できますが、それぞれの微生物は、その環境の酸素分圧、pH、水分含量、温度などによって活躍する場が異なっています。これらの環境要因に関する知見は、いずれも純粋培養系で得られているものですが、自然の微生物社会の中で起きている現象をある程度説明することができるでしょう。一般的に、これらの微生物のうち、糸状菌は湿潤な土壤中で活躍するのに対し、細菌は半乾燥状態の土壤中でその役割りが大きくなります。森林のリターなどの分解には糸状菌のうちでも担子菌が重要な意味を持っているのですが、実験室内の培地上ではほとんど増殖しないのであまり注目されてきませんでした。一方、多くの糸状菌がセルロースを分解すること

ができるのと対照的に、分解酵素を持つ細菌は多くはありません。中温性で好気性のセルロース分解細菌の数は場所によって大きく異なり、堆肥が投入された農地や植物根圏には多く存在しているようです。これらの細菌のうちで、*Cytophaga* はセルロースの好氣的分解にとって重要な地位を占め、嫌氣的分解には *Clostridium* が主要なものです。

セルロースの分解過程は次のように考えられています。セルロースが単糖、すなわちグルコースにまでなるのに 1)  $C_1$  セルラーゼ、2)  $C_x$  セルラーゼと呼ばれる 1, 4- $\beta$ -グルカナーゼおよび 3) 1, 4- $\beta$ -グルコシダーゼの三つの酵素が関与しているようです。 $C_1$  セルラーゼについては不明な部分も多いのですが、 $C_x$  セルラーゼと共同して働き、最終的にはセロビオースを生成します。最後に、これらの糖は 1, 4- $\beta$ -グルコシダーゼによる加水分解を受けてグルコースとなります。これらの一連の過程をセルラーゼシステムと呼んでいますが、土壌中の本システムの活性を測るために、土壌中に基質となる種々のセルロース材料を添加して一定期間経過後、生成してくる還元糖量を測る方法や基質の減少量を測る方法などがあります。

### 3. セルロース分解活性の分布

私たちは、これまで農薬の非標的生物に対する影響についての研究を行ってきていますが、その中で前述のような観点から、土壌中におけるセルロース分解活性に及ぼす農薬の影響をとりあげ、本活性を評価する際の問題点について検討を加えてきました。

分解活性の大小は必ずしも分解菌の存在の多寡と一致するものではありませんが、その分布の様子を推定することは可能でしょう。分解菌そのものの計数方法もいくつか提案され、中でも MPN 法、CMC 平板法がよく用いられています。一方、活性測定法については先に少し触れましたように、採取土壌について酵素化学的に測定する方法とセルロース基質を土壌中に埋め込み、*in situ* のオーバーオール活性を測定する方法があります。私たちは、出来るだけ現場の状況を把握したいという立場から、後者の方法を用いて *in situ* の活性について検討を加えています。



あらかじめ秤量した、ろ紙にポリエチレンを裏打ちしたシート（ベンチコートシート）を土壤中に埋め込み、一定期間経過後に回収し、水中に浸漬して付着した粗大粒子を落した後、乾燥させます。乾燥重量を測定した後、550°C で 2 時間灰化し、灰分を秤量してろ紙部分に付着していた土壤粒子の重量をさし引いて、元の重量との差をセルロースの分解量とします。

先にも述べましたように、当初、農薬連用土壤中のセルロース分解活性を検討することが目的でした。土壤は不均一であると誰しも考えていますが、実は微生物相やその活性の不均一分布に関する知見は少なく、サンプリング方法についての研究もごく限られているのが現状です。そこでまず、各農薬処理区毎におよそ 10 cm 間隔にシートを 100 枚ずつ埋め込み、その分解量を測定しました。図 6 にその頻度分布を示しましたが、測定値の変動が予想以上に大きかったことに驚きました。同一区内でも、10% 程度の分解率しか示さないシートと 90% 近くの分解率を示すものがあり、これらの測定値から計算すると、分解率がおおよそ 50% に達した時の標準誤差を  $\pm 1$ ,  $\pm 2$ , あるいは  $\pm 3\%$  にするためには、それぞれ 196, 49, あるいは 22 枚のシートをおよそ 10 cm 間隔に埋め込む必要があります。これは、これより以前に実験室内で、篩を通してよく混和した土壤を用いて本法の精度について行った実験で得られた結果の数倍のバラツキが生じたこととなります。このことは、野外におけるセルロース分解活性の分布が不均一であり、この不均一性に関するより詳細な知見がない限り、どこに、何枚のシー

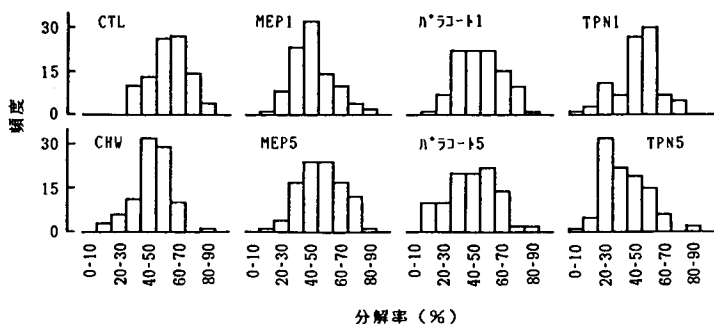


図 6 農薬散布園場で測定された各試験区土壤中のセルロース分解率のヒストグラム

トを埋め込めば、その地点の分解活性を代表するデータが得られるのかわからないことになります。

そこで次に、土地利用の異なる土壌中における分解活性の微細分布について検討を加えることにしました。畑地、水田、果樹園および森林にそれぞれ試験区を設け、畑地および水田では、栽植されている作物を一旦抜き取り、シートを埋め込んだ後、再び元の状態に植えて栽培を続けました。また果樹園および森林については、樹木からおおよそ 3 m 離れた地点にシートを埋めて試験しました。水分が下に移行できるように 2.5 cm ごとに切れ目を入れた  $45 \times 54 \text{ cm}^2$  のシートを各地点 2 枚ずつ、ろ紙面を下にして地下 10 cm のところに水平に埋め込みます。一定期間後(それぞれの試験地点での分解活性が異なるため、それぞれの地点でおおよそ 50% のセルロースが分解されたと推定された時)、回収し、あらかじめポリエチレン側に書き入れたマスメに沿って  $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$  の大きさに切り取って、前述のようにセルロース部分の減少重量からそれぞれの分解率を算出します。このようにして 512 単位 ( $40 \times 80 \text{ cm}^2$ ) 全体について分解率を求め、分布型の判定を行います。

夏期および冬期における各地点の水平分布についての結果を図 7 に、また図 8 にはそれぞれの分解率のヒストグラムを示しました。畑地および水田では、平均値からの標準偏差は 20~30% (分解率にして) であったのに対し、果樹園および森林では、それぞれ 30~40% および 40~60% となり、ヒストグラムも裾広がり型となっています。特に森林では分解率が 10% 以下および 90% 以上の頻度が高く、また、分解活性の高い場所と低い場所が近接して存在するなど、極めて不均一に分布し、しかも明瞭な分解活性の集中が認められます。

植物生態学の分野では、一定面積内で植物個体がどのように配列しているかを示す時に分布様式という言葉が用いられます。普通には 1) ランダム分布、2) 集中分布、3) 規則分布という三つの基本型が考えられています。このような分布様式の判定法として種々のものが考案されていますが、ここでは森下の分散指数 ( $I\delta$ ) 法<sup>3)</sup> による判定を試みました。ただし、 $I\delta$  を算出する際、 $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$  のシートの分解率を最小方形区内の個体数に置

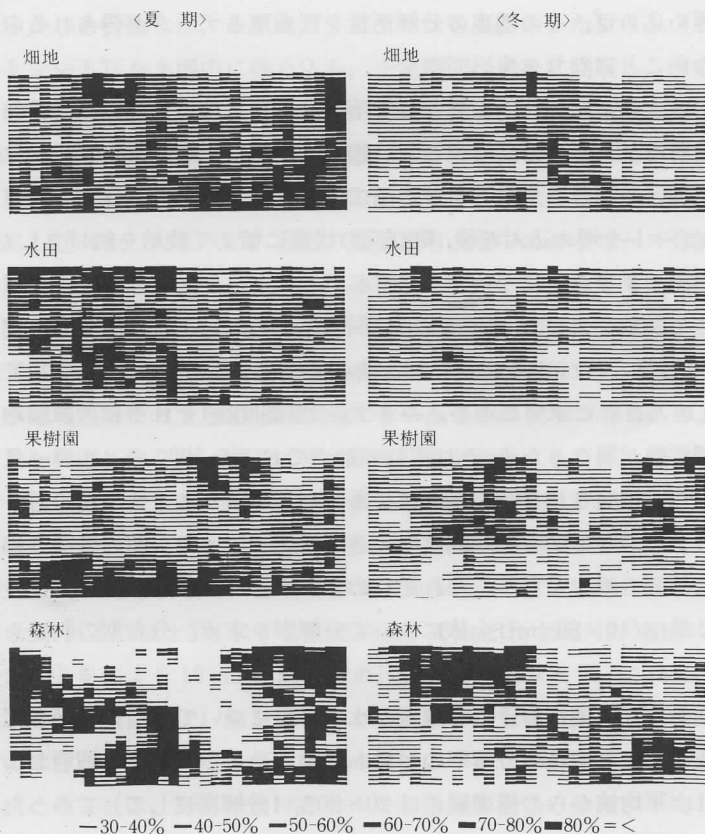


図7 夏期および冬期における畑地、水田、果樹園および森林土壌中のセルロース分解活性の水平分布

き換えて計算しました。

森下の  $I\delta$  は次のように定義されています。 $q$  個の方形区の中での個体数をそれぞれ  $n_1, n_2, \dots, n_i, n_q$  とし、総個体数を  $N$  とする標本集団における  $\lambda$  の不偏推定値  $\delta$  は次式によって求めることができます ( $\lambda$  は SIMPSON の多様度指数と呼ばれ、個体のグループへの散らばり具合を示す尺度です)。

森下はこの  $\delta$  に方形区数

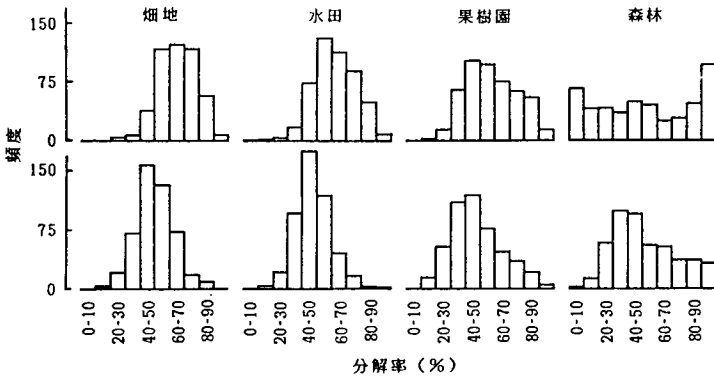


図8 畑地、水田、果樹園および森林土壌中の40 cm×80 cmの区画内で2.5 cm×2.5 cm毎に測定されたセルロース分解率のヒストグラム  
(上段:夏期, 下段:冬期)

$$\delta = \frac{\sum_{i=1}^q ni(ni-1)}{N(N-1)}$$

に  $q$  を乗じた値  $I\delta = q \cdot \delta$  は個体の分布を表わす尺度として使用でき、 $I\delta$  一面積曲線の形から植物個体の分布様式と、集中分布をしている場合の集中斑の大きな大きさを知ることができるとしています。また、方形区の大きさ  $2S$  の  $I\delta$  に対する方形区の大きさ  $S$  の  $I\delta$  の値との比を  $S$  に対してプロットした折線グラフからより詳しく集中斑の平均の大きさを知ることとも可能です。

図9に各試験地点の256単位(計算のために512単位を2分割した)ごとの  $I\delta$  一面積曲線を示しました。畑地では夏期、冬期とも集中斑を持つと判定されたがその集中性は弱く、また水田では片側の256単位はランダム分布、反対側は弱い集中分布と判定されます。果樹園では夏期、冬期とも集中斑内の分布が規則的で、小さな集中斑を持つと判定され、畑地、水田に比べると強い集中性を示しています。森林では夏期、冬期とも  $I\delta$  は極めて大きく、他の試験地点に比べて非常に強い集中性が認められます。また、果樹園の集中斑は  $100 \text{ cm}^2$ 、森林のそれは  $400 \text{ cm}^2$  が平均的な大きさと言

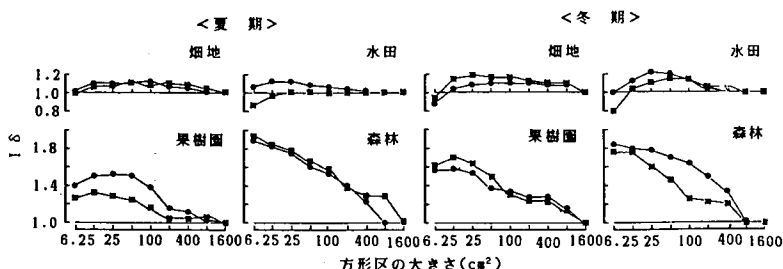


図9 畑地、水田、果樹園および森林土壤中におけるセルロース分解活性の分布型を示す森下の  $I\delta$  曲線  
測定した 512 単位 ( $40 \times 80 \text{ cm}^2$ ) を 2 分割し 256 単位 ( $40 \times 40 \text{ cm}^2$ ) 毎 (●および■) に分布型を判定した

えそうです。

以上のように、土壤中におけるセルロース分解活性は、ある集中性を持ちながら不均一に分布しており、また、土地利用のされ方によってその不均一性も大きく異なっています。耕耘やしろかきのように、土壤を攪拌することの多い畑地や水田では分解活性の集中性が低く、ほとんど攪拌されることがのない果樹園や人為的に攪拌されることがのない森林では集中性が強く、分解活性の分布状態は土壤の攪拌の程度と密接な関係があるものと推察されます。もちろん、他の要因、例えば供給される有機物の種類の違いや土壤動物相、微生物相の違い、土壤の構造上の違いも考慮される必要がありますが、いずれにしても *in situ* での種々の測定や土壤サンプリングにあたって土壤の不均一性が十分考慮されなければならないことは確かなようです。

#### 4. おわりに

私たちが野外の土壤を相手に仕事をしていると、いつも均一な系で研究をしている人たちからは「野外で行われる実験のデータはバラツキが大きすぎて使いものにならない」と言われることがあります。その時に「野外でのデータはこんなものですよ。試験管内の様にはいきません」と言ってしまうこともよくあります。が、それで済ませてしまっているのでしょうか。たしかに現場は恐ろしく複雑な世界ですが、実験室内の均一な系に移せな

い部分（現在ある方法では移せないと考えられている部分をも含んで）にこそ、土壤微生物生態学にとっての重大なことがひそんでいるように思えます。しかし、今のところ、現場をありのままに記述するための方法の十分な蓄積がないのも事実ですから“移せない部分”を見ることは容易ではありません。先に「森林のリターの分解には、担子菌が重量な意味を持っているのですが、実験室内の培地上ではほとんど増殖しないのであまり注目されてきませんでした」と述べました。これまでの微生物研究では、実験室内で旺盛に増殖する微生物が研究対象となってきました。よく見えるからです。今まで見えなかったことを見えるようにしようとする強い興味とそのための方法の開発、その方法によるデータの積み重ねが必要だと思われる。最近、服部らは、平板法に関する一連の研究の中で、これまで私たちが見えていなかった、土壤細菌の土の中での生活のし方についての貴重な情報を得ることに成功しています。これまでの平板法の考え方ではとても見えなかったことだと思われます（詳しくは本書…）。一方、私たちの用いたセルロース分解活性測定法は、これまでの測定法に比べるとより微細な分布を調査するための有力な方法といえるでしょう。土壤は不均一だとよく言われながら、その微生物性を検討する際に不均一性を正面に据えて行われた研究は多くありません。したがって、供試土壌を採取する際、どのような方法で、何点の試料を何処から採取すればいいのかはいつも研究者を悩ませます。金沢<sup>1)</sup>、染谷<sup>2)</sup>らは、このことについての一定の結論を導いていますが、不均一性に関する情報がより豊かであれば、このような問題ももう少し楽に取り扱えるかもしれません。

ここに示したセルロース分解活性の分布に関するデータが、土壤中での微生物の分布が極めて不均一であることを再認識すると同時に、不均一性の原因を探ってみたいという興味を引き起こさせるのに役立てば幸いです。

## 参考文献

- 1) 金沢晋二郎, 金 澄玉, 長谷部亮, 高井康雄: 水田土壌の微生物性および化学性に関する分析値のバラツキ, 土肥誌, 52, 187-192 (1981).

- 2) 染谷 孝, 古坂澄石: 水田土壌の好気性セルロース分解菌 —— 方法上の諸問題をめぐって ——, 土と微生物, 23, 23-31 (1981).
- 3) MORISHITA, M.: Measuring of the Dispersion of Individuals and Analysis of the Distributional Patterns. Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. E (Biol.), Vol. 2, No. 4, 215-235 (1959).

## 6. 平板法による土壌中の細菌の 検出・定量

服部 勉

---

### 1. はじめに

平板法は、土壌中で生活している色々な細菌を検出したり定量したりする上で、もっとも強力な技法であります。したがって、土壌の微生物についてのアセスメントをしようとする時、この技法に頼らなければならない場合が非常に多いと思われます。一方、細菌の検出・定量法としての平板法には、従来から色々な弱点、欠点が指摘されてきております。また、平板法の基礎に関する検討は、これまで余り注目されてきませんでした。

本稿では、こうした事情を考慮しまして、平板法の背後にある基礎的な問題に光をあてながら、この技法の具体的応用の仕方、今後解明される必要のある問題点について、考えてみたいと思います。さらに、平板法によって得られる情報の性格、問題点についても、できるだけ立ち入って検討してみたいと思います。

### 2. 平板法の諸前提

平板法は、ペトリ皿上に播いた細菌細胞を寒天培地を用いて培養し、生ずる細菌細胞の集団（コロニー）を観察し、そこから色々な情報を得たり、細菌の純粋培養を作ったりする技法であります。この技法を使う場合、私たちはいくつかの前提の下に考えます。その主なものを掲げますと、

- (1) 試料の細菌溶液は均一で、各平板に同量ずつ分注できる。



(2) 平板上の生きている各細胞は、もし栄養やその他の培養条件が適当であれば、培養によって増殖し必ず一個のコロニーを形成する。

(3) 各細胞の増殖は、他の細胞の増殖によって影響を受けない。

前提(1)は、理論的にはサンプリングの統計的問題であり、技術的には細菌溶液を分注する器具の表面への細胞の吸着の問題なども含まれます。本稿では、とくに前者の問題を考察することにします。前提(2)は、少なくとも二つの基本問題と関連します。すなわち、培地の選択性の問題と生細胞の定義の問題であります。この他、ファージや細菌捕食細菌が混在したり、テンペレート・ファージ所有菌が存在したりする時、問題となります。前提(3)は、抗生物質や栄養因子を生産する細菌が存在する時、また捕食性細菌が存在したりする時、問題となります。

### 3. 水溶液中に分散する細菌細胞のサンプリングの統計的問題

細菌細胞を水溶液中に均一に分散させることはサンプルによっては大変難しいことです。土壤の場合がそうです。このことは別に考えるといたしまして、とにかく均一に細胞が分散している溶液では、各細胞はどのように分布しているのでしょうか。ここで「均一」という言葉を使用しましたが、本当は「均一」ではなく、「ランダム」という言葉が適切であります。「均一」と「ランダム」では、図1のように大変事情が違います。細胞がラ

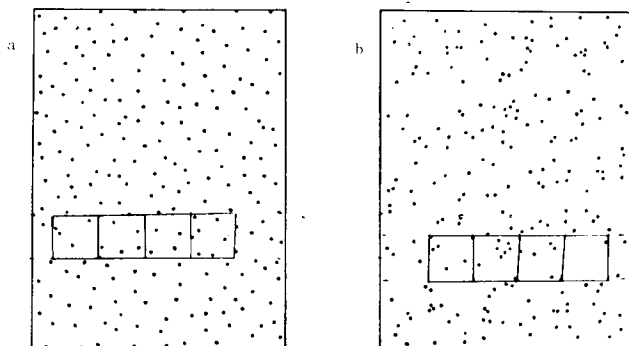


図1 均一な分布とランダムな分布

(a) 均一分布, (b) ランダム分布

表 1 細胞が一枚の平板に分注される確率  
(細胞溶液を 1 ml ずつ各平板に分注するとする)

溶液中の 細胞平均個数/ml	分注される確率 (%)			
	0 個	1 個	2 個	3 個
1	36.8	36.8	18.4	6.1
2	13.5	27.1	27.1	18.0
3	5.0	14.9	22.4	22.4
4	1.8	7.3	14.7	19.5
5	0.7	3.4	8.4	14.0

ンダムに分布している溶液の一定容量中に含まれている細胞の数は、図 1 に示したように、決してどの場合も同じということにはなりません。ケース・バイ・ケースで、かなり変動いたします。では、この変動には何か規則性があるのでしょうか。このことを統計的に検討したのは、Fisher ら (1922) でした<sup>1)</sup>。彼は、1907 年に発表された Student の研究を利用しました<sup>2)</sup>。すなわち血球計算盤を用いて酵母細胞を計算する際、各マス目に入る細胞数のばらつきは、ポアソン分布にしたがうという結論を、各平板に分注される細菌細胞数にも適用できることを示したのです。

ポアソン分布にしたがって細胞が各平板に分配される時、問題となるのは溶液中の細胞数が小さい時です。表 1 に示したように、各平板に注ぐ溶液中に平均数個以下の時は、一個の細胞も平板に入らない確率が相当大的ことになります。そうした場合、その細菌細胞の検出に失敗し、見逃す可能性が大きいことになります。また、たとえ検出しえても、その細胞数についての測定値は、かなりばらつきが大きいことになります。平板法を用いる時、こうした統計的事情を考慮する必要があります。

#### 4. 培地の選択性と栄養物濃度

細菌の利用する栄養物には色々な種類があります。また、土壌には医学細菌学で普通利用される培地より栄養物濃度が小さい培地でしか、よく増殖できない低栄養細菌とよぶ細菌が多数います。こうした諸事情が、培地の選択性を生み出していると考えられます。各細菌には栄養物の代謝に必

要な色々な酵素を合成できる特有の遺伝情報が含まれておりますが、同時に培地中の栄養物の濃度に反応してそうした酵素の合成を誘導したり阻止したりする機構も含まれております。培地の選択性には、栄養要求菌のように特定の生体物質を合成する能力がないことに起因するものもありますが、他方、低栄養細菌のように過剰の栄養物に負の反応をすることによって、増殖できない場合がかなり多いと考えられます。つまり、肉汁やカザミノサン、アルブミン、酵母エキスなどの複合栄養物を少量に含む培地は、かなりの程度非選択的になっていると考えられます。私どもは、手軽な培地として肉汁培地を 100 分の 1 に希釈したものを、DNB 培地として使っています<sup>3)</sup>。

栄養物の中には、有機物の他に塩類も含まれますが、塩類の濃度にも十分注意する必要があります。土壤に住む低栄養細菌の多くは、0.5% の食塩の存在でもよく増殖できません。この塩感受性は、共存する有機物の種類や濃度によっても、変化します。またカルシウム・イオンやマグネシウム・イオンによっても、影響を受けます。

ここで土壤細菌のコロニー形成で、全く不思議なもうひとつの現象について触れておく必要があります。それは、土壤分散液をウイノグラドスキー塩液であらかじめ処理をしますと、コロニー形成の速度が速まると同時に、その数も大変増加するという事実です。今だに、この理由はわかりません<sup>4)</sup>。

## 5. 生きた細菌細胞と増殖

細菌細胞が生きているかどうかの判別のひとつの基準として、これまでコロニーの形成能力があげられてきました。しかし、果たしてすべての生細胞が、肉眼で観察できるコロニーを形成することができるのでしょうか。この問題を考える手始めに、培養時間と細胞集団のコロニー形成過程との関係を、考えておきたいと思います。一般にコロニー形成は図 2 のように、対数曲線的に進行します。それは細胞集団の増殖開始が、対数曲線的に起こるからだというのが、FOR モデルの考え方であります<sup>5),6)</sup>。

顕微鏡下で各細胞の分裂（分裂の結果できた細胞数を数字で示す）と時

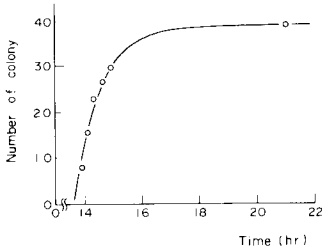


図2 細菌のコロニー形成過程  
(大腸菌の場合)

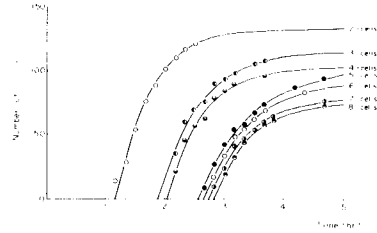


図3 細菌細胞集団の分裂過程  
(大腸菌の場合)

間との関係を見ますと、コロニー形成と全く同じような対数曲線で細胞分裂が進行します(図3)。ところで、図にみられますように、元の細胞で1回、2回、3回…分裂回数を進めるものの数は、次第に減っていくことが目につきます。これは、分裂を途中で中断するクローン(ひとつの細胞から生まれた細胞の集まり)が存在するためであります。そのことは実際の観察でも確かめられております。おそらくこの分裂中断と同じメカニズムは、元の細胞が1回目の分裂を前にしている時も起きていると考えられます。2回以後の中断件数から、1回目の中断件数を推定することもできそうです。土壌や海水、底泥などの自然環境に住む細菌では、1回も分裂しない細菌細胞の生ずる件数が圧倒的に大きいと、私は考えております。

このようにみてみますと、生きた細胞は必ずしも増殖し、コロニーを形成するとは言いえないことになります。平板法によって、土壌などにいる細菌を確実に検出し、定量しようとする時、このような事情が大きな困難を生み出す可能性があります。

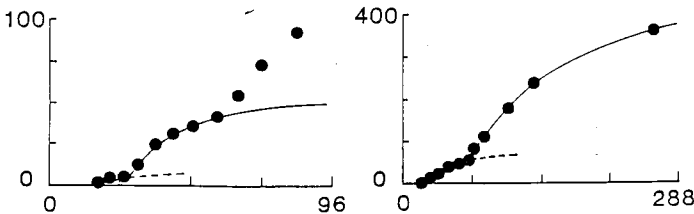


図4 土壌細菌のコロニー形成過程  
左は96時間まで、右は288時間までの結果を示す

この他に試料中にファージや細菌捕食細菌が共存していて相手細菌を溶菌させる場合がありますが、その実態はまだ余り研究されていません。また、自然の中には、溶原性の細菌細胞が多数いるといいますが、その実態もまだ解明されていません。さらに、抗生物質生産菌のコロニーの周りでは、分泌される抗生物質によって、他細菌のコロニー形成が阻害されることがよくみられます。これらは今後解明されるべき重要課題の一部であります。

## 6. 細菌細胞の凝集、固体粒子への吸着

平板法では、試料中の細胞はみなばらばらになって水溶液中に分散していることが、前提として要請されます。しかし、自然に住む細菌には、同種間または異種間で細胞が結合したり凝集したりすることが、しばしばあります。こうした結合や凝集体は、水溶液中でも容易に分散しないことが多く、測定の障害となります。

また土壌ではさまざまな大きさの土壌粒子に細胞が吸着したり、粒子内部に包み込まれたりしています。こうした細菌も容易には、水溶液中に分散しません。分散させるためには、リン酸緩衝液、食塩水、表面活性剤などを使ったり、振盪や音波処理、ブレンダー処理など行なったりします。私たちは、土壌を水分で何度か洗い出す洗浄法とその後音波処理で団粒を破壊し、内部の細菌を強制的に分散させる洗浄・音波法を開発し、土壌団粒中の細菌分布を研究してきました。その概略は、本書で山本先生、菊本先生が述べておられます。

いずれにしても、2種以上の細菌細胞が凝集したり吸着したりしていても、平板上では一個のコロニーとなりますので、対象とする細菌の検出・計数に誤った判断を下す可能性があります。またこれと関連して、平板に播かれた細胞が互いに接近していたために、二個またはそれ以上の別々のコロニーを形成すべきものが、互いに重なりあって恰も一個のコロニーのように現われることも、一定の確率で起きることも考慮すべきでありましょう<sup>7)</sup>。

## 7. 土壌細菌平板の培養時間

単菌からなる細胞集団のコロニー形成は、すでに述べましたように対数曲線によって表されます。したがって平板の培養時間は、対数曲線がx軸とほぼ平行に達するころまで行なえばよいことになります。ところで土壌の細菌は多種類からなっており、その平板の培養時間はどれだけがよいのか見当が付きかねます。しかし、培養期間中にできるだけ短い間隔でコロニー数を計測し、グラフにしますと、図4に示しましたように、対数曲線をつぎつぎ積み上げた曲線にそって、コロニーが増大していくことがわかります。しかも特定の細菌(群)は、必ずいずれかの対数曲線上でコロニーを形成します<sup>9)</sup>。ですから、培養時間を決める時、どの段のグループのコロニーまで観察するかを決めれば、結論は容易にできます。ただ、土壌の中には、半年以上の培養によってぼちぼちコロニーを作る細菌もいることを忘れてはなりません。

こうしたコロニー形成曲線は、土壌の細菌フロアの解析に新しい可能性を開きつつありますが、このことについて、別の機会に述べたいと思います。ただここでは、コロニー曲線の立ち上がり方(FORモデルのラムダ値)によって増殖しつつある細菌グループや吸着状態にある特定細菌(硫酸還元菌)を検出できる可能性が出てきていることを指摘しておきましょう<sup>9,10)</sup>。

## 8. おわりに

平板法には、以上のべましたことの他にも色々な理論的問題、技術的問題があります。そうした諸問題を検討すればするほど、平板法の利用価値は高まると思います。それと同時に、誤った考え、先入観による平板法の結果に対する適切でない期待や不信も、大いに減るものと思います。また技術的な改善も大いに進められる必要があります。技術的には自動化を急ぐことが大切だと思います。しかしそれは今日あるようなただコロニーを数えるといった単純な自動化ではなく、いま私たちが目を輝かし頭を使ってコロニー形成を観察しているその状態を自動化するというのが、最小の

要請であります。

## 参考文献

- 1) R.A. Fisher, H.G. Thornton and W.A. Mackenzie. The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial population. *Ann. Appl. Bacteriol.*, **9**, 325-359 (1922).
- 2) Student. On the error of counting with a haemocytometer. *Biometrika*, **V**, 351-360 (1907).
- 3) 服部 勉, 服部黎子, 太田寛行, 塩田悠賀里, 低濃度栄養条件下の微生物, 微生物の生態, **6**, 57-73 (1979).
- 4) M. Dabek-Szreniawska and T. Hattori. Winogradsky's salt solution as a diluting medium for plate count of oligotrophic bacteria in soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 517-518 (1981).
- 5) 服部 勉. 微生物学の基礎. 学会出版センター (1986).
- 6) T. Hattori. *The Viable Count: Quantitative and Environmental Aspects*. Springer-Verlag (1988).
- 7) 熊田 薫, 小池和子. 平板上のコロニー密度の上限について. 日本微生物生態学会報, **3**, 1-10 (1988)
- 8) 服部 勉. 細菌コロニー形成曲線と低栄養細菌. 化学と生物 (印刷中).
- 9) Y. Suwa and T. Hattori. Detection of proliferating bacteria in soil population by the analysis of colony forming curves. *J. FGen. Appl. Microbiol.*, **33**, 511-515 (1987).
- 10) M. Fukui and S. Takii. Colony formation of free-living and particle associated sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecology* **73**, 85-90 (1990).

## 7. 微生物アセスメントをめざして

### —— まとめて代えて ——

服部 勉

土壌の中にいる特定の微生物を正確に検出・定量することは、本書の各章のお話からもうかがえますように、大変困難な仕事であります。特定微生物（たとえば遺伝子組換え微生物）の他微生物への影響を考える場合には、さらに大きな困難が横たわっていると思われます。では、どのようにしてこの困難を克服していけるのでありましょうか、本ワークショップのまとめて代えて、若干の問題点について考えておきたいと思います。

#### 1. 微生物の分布を考える

微生物が土壌空間にどのように分布しているのでしょうか。この問題は、色々な角度から考えてみる必要があります。第一に大小異なった尺度の空間の問題、第二に土壌を覆っている植物の種類、そこに住む動物の種類などによる微生物分布の違い、第三に人間の活動の影響の考慮であります。いかにそれぞれの角度で考慮される必要のある視点を、思いつくままに列挙しておきましょう。

空間尺度：南北両半球，気候長・土壌帯；大陸・列島・孤島，海拔高度；地域，微小立地的空間，局部的空間；土壌層分化，団塊構造，団粒間，団粒構造内部など

植生：各種森林，草種別草地，作物別耕地，砂漠など；植物葉面，幹表面，花表面，種子表面，根面，根圏など

社会的影響：都市内部，都市近郊，村落，重工業地帯，ハイテク工業地帯，その他特別な工業排気ガス発生地帯，高速道路周辺，ゴルフ場とその周辺など。



これらのリストは全く不完全なものですが、いずれも微生物の分布を考える時、よく考えてみる必要がある視点であります。

## 2. 微生物の特定のし方と遺伝子の伝達性をめぐって

微生物のもつ遺伝子の一部が変異したり、細胞から細胞へ伝達されたりする現象は、土壌中の特定微生物を検出・定量し、微生物アセスメントに役立てようとする作業に新しい問題を持ち込んでいます。

土壌中に住む微生物を検定・定量しようとする多くの場合、その特定のし方は特定の化学的能力によるのが現状であります。たとえば、本書の第1章では破傷風菌毒素産生能、第2章ではボツリヌス毒素産生能、第5章ではセルロース分解能をそれぞれ保持する細菌グループが対象となっております。しかしこれらの能力は、特定の遺伝子（群）によって支配されるもので、もしその遺伝子（群）が細菌細胞からなくなったり、他の細菌細胞に伝達されたりしますと、その細菌細胞は対象から外されたり、新しく対象に入れられたりすることになります。しかも、このような出入りが絶えず行なわれているとしたら、一体特定の化学的能力に頼って行なうこの種の検出・定量はどんな意味をもつことになるのでありましょうか。

また、第3章の野菜軟腐病細菌のファージ特異性も、どうやらこの細菌の関連遺伝子の変異にもとづくように想像されます。もしそうだとしますと、特定のファージ特異性をもつ病原菌の検出・定量することが、どんな意味をもつことになりましょうか。ファージ特異性の変異機構とその速度を含むより広範な調査・検討が、より重要になる可能性があります。

いずれにしても、こうした微生物遺伝子の変異性と伝達性の考慮を伴った微生物の検出・定量でなければ、微生物アセスメントに役立つことは少ないといえるのではないのでしょうか。

## 3. 微生物ポピュレーションの変動性の考慮

一般に土壌中の微生物ポピュレーション全体は、比較的安定していると考えられますが、特定の微生物がある条件の下できわめて短時間に激しく変動することは、大いにありうることであります。恐らくこうした激しい

変動は、局部的に起こるものと想定されます。この変動の背景にある各種微生物間の相互関係は、予想を越える多様さ複雑さが含まれていると考えられます。とくに原生動物がときたま見せる敏速な行動は、注目に値します。もともと微生物アセスメントの仕事は、こうした微生物ポピュレーションの変動性の予測に基礎をおくものであります。しかしこのような変動性の予測は、微生物生態学的知見に大きく依存する性格のものであります。

いずれにいたしましても、微生物アセスメントという仕事と微生物生態学的研究とは、それぞれ異なった目的、手法が要求される反面、互いに補完しあうものでもあります。とくに現段階では、後者の役割が決定的に重要性であるといえます。今回のワーク・ショップが、こうした両者の関係により多くの方々が目を見て頂きるのに、役立つならば幸いだと思えます。大変長い時間、ありがとうございました。

IGE シリーズ 7

土壌微生物アセスメントの背景 (1)

— 検出・定量の諸問題 —

---

発 行 1990 年 3 月  
発行者 東北大学遺伝生態研究センター  
〒 980 仙台市青葉区片平 2-1-1  
☎ 022-227-6200 (代)  
印刷所 笹氣出版印刷株式会社